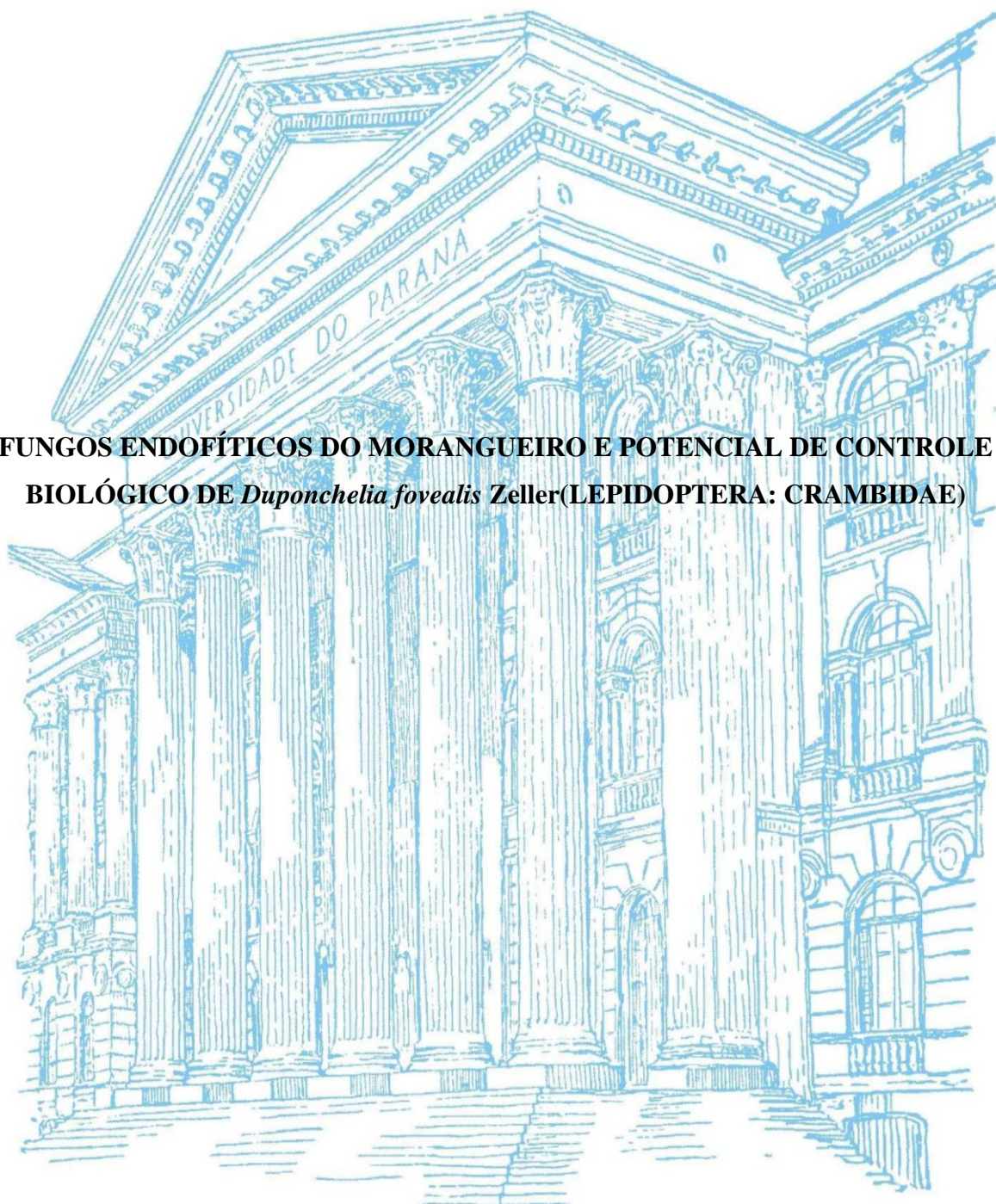


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**RAFAELA FERREIRA AMATUZZI**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DO MORANGUEIRO E POTENCIAL DE CONTROLE  
BIOLÓGICO DE *Duponchelia fovealis* Zeller (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**



**Curitiba  
2014**

**RAFAELA FERREIRA AMATUZZI**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DO MORANGUEIRO E POTENCIAL DE CONTROLE  
BIOLÓGICO DE *Duponchelia fovealis* Zeller (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ida Chapaval Pimentel  
Co-orientadores: Maria Aparecida Cassilha  
Zawadneak e Patricia do Rocio Dalzoto

**Curitiba  
2014**

Amatuzzi, Rafaela Ferreira

Fungos endofíticos do morangueiro e potencial de controle biológico de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: crambidae). / Rafaela Ferreira Amatuzzi. – Curitiba, 2014.

51 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Ida Chapaval Pimentel

Co-orientadores: Maria aparecida Cassilha Zawadneak

Patrícia do Rocio Dalzoto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Lagarta 2. Morango -- Doenças e pragas 3. Fungos I. Título II. Pimentel, Ida Chapaval III. Zawadneak, Maria Aparecida Cassilha VI. Dalzoto, Patrícia do Rocio V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.2



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**“FUNGOS ENDOFÍTICOS DO MORANGUEIRO COM POTENCIAL  
DE CONTROLE BIOLÓGICO DE *Duponchelia fovealis* Zeller  
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)”**

Por

**RAFAELA FERREIRA AMATUZZI**

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos  
professores:**

  
**Prof.ª. Dr.ª. Ida Chapaval Pimentel (presidente)**

  
**Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves**

  
**Dra. Maria Silvia Pereira Leite**

**Curitiba, 26 de março de 2014.**

## RESUMO

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis*, tem causado danos nas lavouras de morangueiro, podendo levá-la à morte quando em altas infestações. Uma das possíveis alternativas para o manejo da praga é o controle biológico por fungos endofíticos que melhoram a aptidão competitiva da planta; aumentam a tolerância ao estresse abiótico e protegem contra patógenos e herbívoros. Embora muitos gêneros de fungos endófitos sejam citados como entomopatogênicos, não há trabalhos que avaliem seu potencial na cultura ao morangueiro. Este trabalho visa avaliar o potencial de fungos endofíticos isolados de folhas de morangueiro para o controle biológico de *D. fovealis*. Para isso, foram coletadas 400 folhas do morangueiro da cultivar 'Albion' de quatro áreas de cultivo no Município de São José dos Pinhais e Pinhais, Paraná - Áreas A, B (cultivo orgânico); C, D (cultivo convencional). As folhas passaram por um processo de desinfecção superficial, foram cortadas em fragmentos de 1cm<sup>2</sup> e depositadas em 400 placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de tetraciclina. As placas foram incubadas a 27 ±2°C por 30 dias. Os fungos foram identificados com base na macro e micromorfologia. Foram isoladas 517 colônias, o que equivale à taxa de colonização de 32,10%. A área A, por empregar práticas agroecológicas por um longo período, apresentou números significativamente superiores de colônias isoladas em relação às demais. Treze gêneros foram identificados *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Penicillium*; *Ulocladium*, *Biopolaris*, *Lecanicillium* e *Phoma*. Para os bioensaios de virulência contra lagartas de 3º ínstar de *D. fovealis* foram selecionados oito isolados pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Lecanicillium*, *Paecilomyces* e *Cladosporium*. A mortalidade das lagartas entre os tratamentos com os fungos na concentração 1,0 x 10<sup>8</sup> esporos/mL variou entre 54 e 98%, os fungos mais virulentos pertencem ao gênero *Fusarium* e *Paecilomyces*. O isolado *Paecilomyces* (G41) foi selecionado para ser empregado em bioensaios para determinação da concentração letal (CL<sub>50</sub>). Foram testadas cinco concentrações diferentes (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup>) sobre as lagartas de 3º instar de *D. fovealis*, obtendo-se uma CL<sub>50</sub> de 4,7x10<sup>8</sup> esporos por mL.

Palavras- chave: *Fragaria x ananassa*. Controle microbiano. Lagarta-da-coroa.

## ABSTRACT

The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* has caused damage to strawberry crops by drilling the crown of the plant area, with progressive drying of leaves and can take her to death while in high infestations . One of the alternatives for pest anagement is biological control fungal endophytes that improve the competitive ability of the plant; increased tolerance to abiotic stress and protect against pathogens and herbivores. Although many genera of endophytic fungi are cited as entomopathogenic , no studies assessing its potential in the strawberry crop . This study aims to evaluate the potential of endophytic fungi isolated from strawberry leaves for the biological control of *D.fovealis*. For this, 400 were collected in strawberry leaves ' Albion ' four growing areas in the city of Pinhais , Paraná areas A, B (organic cultivation) C , D (conventional farming). Leaves have undergone a process of surface disinfection were cut into 1cm<sup>2</sup> pieces and placed in a Petri dish containing 400 PDA culture medium plus tetracycline (100 µg.mL<sup>-1</sup>). plates were incubated at 27 ± 2 °C for 30 days. fungi were identified based on macro and micromorphology. Were isolated 517, which is equivalent to the fungi colonization rate of 32.10% . The area A, to employ agroecological practices over a long period, showed significantly higher numbers of fungi isolated over others. 13 groups were identified , belonging to the genera *Cladosporium* , *Aspergillus* , *Nigrospora* , *Fusarium* , *Trichoderma* , *Chaetomium* , *Alternaria* , *Paecilomyces* , *Penicillium* , *Ulocladium* , *Biopolaris* , *Lecanicillium* and *Phoma* . For bioassays of virulence against larvae of 3rd instar *D. fovealis* were selected isolates belonging to eight genera : *Aspergillus* , *Lecanicillium* , *Paecilomyces* and *Cladosporium* . The mortality of larvae between treatments with fungi in concentraçãol,0 x 10<sup>8</sup> spores / mL ranged between 54 and 98 % , the most virulent fungi belong to the genus *Fusarium* and *Paecilomyces* . The isolated *Paecilomyces* (G41) was selected to be used in bioassays to determine the lethal concentration (LC<sub>50</sub>) . Five different concentrations (10<sup>4</sup>,10<sup>5</sup> ,10<sup>6</sup>,10<sup>7</sup> and 10<sup>8</sup>) on the third instar larvae of *D. fovealis* were tested , yielding a LC<sub>50</sub> of 4.7 x10<sup>8</sup> spores/mL.

Keywords: *Fragaria x ananassa*. Microbial control. European pepper moth.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>9</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
3.1 <i>Duponchelia fovealis</i> .....	10
3.2 CONTROLE BIOLÓGICO .....	12
3.3 RELAÇÃO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO E HOSPEDEIRO .....	13
3.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	15
<b>4 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>19</b>
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	20
5.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	20
5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	21
5.3.1 Técnica do microcultivo .....	22
5.4 BIOENSAIOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	22
5.4.1 Cultivo das amostras e seleção de meio de cultura .....	22
5.4.2 Teste de virulência.....	23
5.4.2.1 Criação de <i>Duponchelia fovealis</i> .....	23
5.4.2.2 Isolados fúngicos .....	23
5.4.2.3 Produção de esporos .....	24
5.4.2.4 Protocolo do bioensaio de virulência.....	24
5.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS UTILIZADOS NOS BIOENSAIOS DE VIRULÊNCIA.....	27
5.5.1 Extração de DNA.....	27
5.5.2 Amplificação de regiões do genoma fúngico .....	28
5.5.3 Purificação do DNA .....	29
5.5.4 Reação de sequenciamento.....	29
5.5.5 Edição e análise das sequências.....	29
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>

6.1 COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	30
6.2 IDENTIFICAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA.....	31
6.3 SELEÇÃO DE MEIO DE CULTIVO.....	34
6.3.1 Crescimento radial e produção de esporos .....	34
6.4 TESTES DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA SOBRE LAGARTAS DE <i>Duponchelia fovealis</i> .....	37
6.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS POR SEQUENCIAMENTO.....	40
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de pragas na cultura do morangueiro pode causar danos à produção, dependendo da região, do clima, do cultivo, dos tratamentos culturais e do manejo da lavoura; sendo que os prejuízos estão diretamente ligados à destruição das partes aéreas da planta, ataque ao fruto e a transmissão de viroses que podem reduzir o ciclo e a produção da planta (BOTTON et al. 2010).

O morango está entre as espécies cultivadas com maior suscetibilidade a pragas e doenças. Esta condição exige do produtor um contínuo esforço de manejo, especialmente fitossanitário, para que o fruto seja produzido com a aparência e a produtividade capazes de lhe proporcionar lucro.

O uso indiscriminado de produtos fitossanitários pode originar problemas ainda mais sérios, como desequilíbrios ambientais, a eliminação de polinizadores e inimigos naturais (ANTUNES; FILHO, 2005; NONDILLO et al. 2009).

Dentre os insetos que reduzem a produção e qualidade dos frutos do morangueiro, destaca-se a espécie exótica invasora, a lagarta-da-coroa *Duponchelia fovealis* Zeller, 1847 (Lepidoptera: Crambidae). Originária da região mediterrânea e Ilhas Canárias (CABI, 1012). Foi identificada em Portugal atacando principalmente a região da coroa nos cultivos de morangueiros.

A forma com que a praga ingressou no Brasil não é conhecida, podendo ter sido introduzida com material propagativo de plantas ornamentais. Observações realizadas a campo na Região metropolitana de Curitiba revelaram que a lagarta-do-morangueiro ocorre em todo o ciclo da cultura e durante todo o ano. (ZAWADNEAK et al. 2014).

O manejo da espécie no morangueiro vem sendo feito através da aplicação de inseticidas de alta toxicidade, muitas vezes não autorizados para uso na cultura (NONDILLO et al. 2009).

No entanto, a resistência aos inseticidas, ressurgimento de pragas e a preocupação com o impacto ambiental de insumos agrícolas dá urgência para a busca de alternativas, formas de base biológica de controle de pragas.

O impacto sobre as populações de insetos causadas em particular por patógenos fúngicos e virais demonstram o potencial de controle microbiano de pragas (CHARNLEY; COLLINS, 2007).

O controle biológico de espécies invasoras utilizando inimigos naturais tem sido considerado um seguro, eficaz e ambientalmente segura para o manejo de pragas (MESSING et al. 2006)

## 2 JUSTIFICATIVA

A espécie *D. fovealis* foi observada em 2008 nos inventários da entomofauna associada ao cultivo do morangueiro pela equipe do Grupo Técnico da Produção Integrada do Morangueiro (PIMo) - Paraná, no Município de São José dos Pinhais, região Metropolitana de Curitiba. O inseto era desconhecido pelos técnicos e produtores estando presente em baixas densidades populacionais.

A espécie foi identificada pela especialista em Pyralidae, Dra. Alma Solis, do Laboratório de Entomologia Sistemática (USDA), em março de 2010.

Relatos dos produtores indicam que a lagarta-do-morangueiro tem sido observada desde 2007, de forma crescente e abundante em lavouras comerciais de morango (ZAWADNEAK et al. 2014).

A ocorrência de *D. fovealis* no Brasil representa um sério problema para os produtores. Isto se deve ao potencial de dano da espécie, à presença das lagartas durante todo o ciclo da cultura e à ausência de inseticidas registrados para o seu controle.

A lagarta -da-coroa está presente em cultivos de morangueiro nos Estados do Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo, o controle apenas com base em inseticidas, via pulverização, torna-se difícil, devido aos seus hábitos de permanecer na parte basal da planta, muitas vezes no seu interior, ficando assim protegida contra o contato pela molécula inseticida (ZAWADNEAK et al. 2014).

Nesse contexto, há a necessidade de se avaliar diferentes estratégias de controle para o manejo de *D. fovealis* em morangueiro e uma das alternativas é o controle biológico (FADINI et al. 2004).

Para o controle biológico de *D. fovealis* é descrita a utilização de ácaros predadores como himenópteros parasitóides do gênero *Trichogramma* e certas espécies de nematoides entomopatogênicas do gênero *Orius* (FRANCO et al. 2010), entretanto, tratando-se de fungos entomopatogênicos, inexistem estudos para sua utilização no controle da praga.

Entre os diferentes grupos de agentes entomopatogênicos, os fungos, utilizados para o controle biológico, possuem características que os tornam adequados para este uso, como infectar por penetração direta através da cutícula, isto eleva o potencial em causar epizootias que ocasionam alta mortalidade na população de pragas. Portanto, são agentes especialmente bem adequados para o controle de uma ampla gama de pragas (HAJEK; DELALIBERA, 2010).

O presente trabalho visa contribuir com estudos do potencial de fungos endofíticos, isolados da planta de morangueiro, para o controle biológico de *D. fovealis*, que é considerada uma nova praga do morangueiro no Paraná.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Duponchelia fovealis*

A mariposa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera, Crambidae), é nativa de pântanos do sul da Europa (Espanha continental, partes da França, e em Portugal), a região leste do Mediterrâneo (Grécia, Itália, Córsega, Macedônia, Malta, Creta, Sardenha e Sicília), Ilhas Canárias, Síria e Argélia.

É considerada praga estabelecida na Europa, Oriente Médio e África; nos Estados Unidos foi identificada na Califórnia, Arizona, Colorado, Geórgia, Texas e Flórida e também é considerada espécie invasora no sul do Ontário no Canadá (STOCKS; HODGES, 2012).

A lagarta habita preferencialmente a base da planta junto ao solo, alimenta-se de folhas, flores e botões florais, passando posteriormente para o interior da coroa da planta, junto à superfície do solo, uma vez que prefere o ambiente úmido (FRANCO et al. 2010).

A mariposa é considerada praga de vários gêneros e espécies de plantas de interesse econômico, que compreende desde plantas aquáticas a plantas de cultivo comerciais (QUADRO 1).

Os danos associados à *D. fovealis* são descritos como decorrentes da alimentação. As plantas apresentam folhas com furos, murchas ou secas em função do broqueamento na região da coroa da planta. As flores e os frutos também são danificados. No material vegetal atacado há a presença de muita teia e excrementos. Em infestação severa as plantas ficam debilitadas, com baixa produtividade e morte precoce. O controle da *D. fovealis* nas áreas infestadas não tem sido

tarefa fácil devido ao seu pequeno tamanho, rápido crescimento populacional e hábitos crípticos (ZAWADNEAK et al., 2014; STOCKES et al., 2012).

QUADRO 1- ESPÉCIES E GÊNEROS DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DE *D. fovealis*.

Espécies e Gêneros de plantas
<i>Alternanthera reineckii</i> “Splêndida”- planta aquática
<i>Alternanthera reineckii</i> “Roseafolia”- planta aquática
<i>Apium graveolens</i> – (aipo) cultivada
<i>Begonia tuberosa</i> - ornamental
<i>Bellis perennis</i> - ornamental
<i>Beta vulgaris</i> - (beterraba) cultivada
<i>Capsicum annuum</i> – “pimenta” - cultivada
<i>Echinodorus parviflorus</i> – “planta espada” ornamental
<i>Ficus triangularis</i> – “figo” - cultivada
<i>Ocimum basilicum</i> – manjerição
<i>Rubus fruticosus</i> - amora
<i>Solanum lycopersicum</i> – tomate
<i>Cucumis</i> sp. – pepino
<i>Fragaria</i> sp.- morango
<i>Lactuca</i> sp.– alface silvestre
<i>Phalaenopsis</i> – orquídeas
<i>Rhododendro</i> sp.– Azaléia
<i>Zea</i> sp.- milho

FONTE: STOCKS; HODGES (2012).

Os adultos têm uma envergadura de 19 a 21 mm por 10 mm de comprimento. As asas são de coloração marrom, com duas finas linhas transversais amarelas e paralelas entre si. A linha mais perto do ápice da asa apresenta um desenho em forma de U na região central. Os machos têm abdome mais afilado e com um tufo de pelos na sua extremidade. Quando em repouso, as asas são mantidas fora afastadas do corpo formando um triângulo. A cabeça e corpo são de coloração oliva-marrom. O abdômen tem cor creme e anéis que o rodeiam. As pernas são castanho claro (STOCKS; HODGES, 2011; ZAWADNEAK et al. 2014).

De acordo com Zawadneak (2011) os ovos são de coloração creme medindo em média 0,3 x 0,6 mm de largura e comprimento respectivamente com formato elíptico. Os ovos podem ser

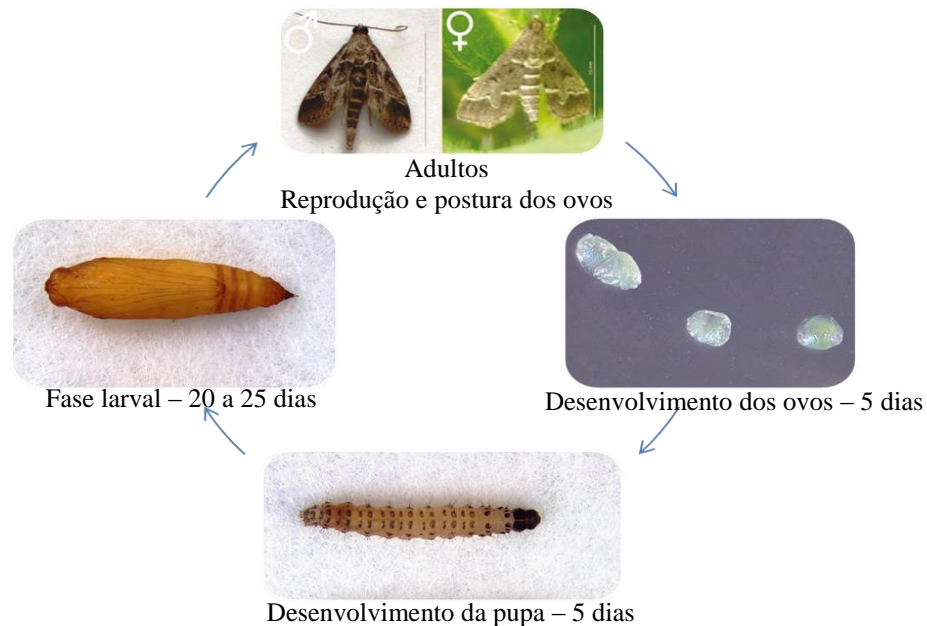
depositados de forma isolada ou em grupo de 3 a 10 unidades. Quando próximos à eclosão das lagartas, são de coloração avermelhada.

As lagartas são de coloração branco-creme a marrom-clara, medem cerca de 20 mm de comprimento no último instar. A cabeça é de cor marrom escura, com manchas escuras no corpo.

As lagartas empupam em um casulo feito de excrementos e partículas do solo. O casulo mede 15 a 19 mm por 9 a 12 mm de comprimento. A crisálida é de cor amarelo pardo, tornando-se mais escura quando próxima da emergência.

Em dieta artificial, o período de ovo a adulto ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , UR de  $70 \pm 110\%$  e fotofase de 12 horas) é de 45 dias. Cada fêmea pode produzir em média 162 ovos durante a sua vida (FIGURA 1).

FIGURA 1. Ciclo de vida de *D. fovealis*



FONTE: O autor (2012).

### 3.2 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação da população de pragas por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica (PARRA et al., 2002). Agentes de controle biológico podem ser uma alternativa aos pesticidas químicos na

agricultura, com benefícios para os consumidores, agricultores e o meio ambiente (MUSETTI et al. 2006).

Entre as vantagens do controle biológico em relação ao controle químico pode-se citar que é uma medida atóxica, não provoca desequilíbrio, não possui contra indicações, propicia um controle duradouro e é eficiente quando não existe maneira de se utilizar o controle químico. Em compensação requer mais tecnologia, possui um efeito mais lento, não é de fácil aquisição, nem sempre pode ser aplicado em qualquer época do ano e, geralmente, é mais caro (PARRA et al. 2006).

Os entomopatógenos estão entre os inimigos naturais de pragas em agroecossistemas e, compreender a ecologia de populações nativas destes organismos, é fundamental para a avaliação de suas contribuições para o controle de pragas (MEYLING; EILENBERG, 2007). Várias estratégias têm sido adotadas no uso de fungos patogênicos a insetos pragas. O mais rentável é o controle biológico artificial, que visa a supressão rápida ou permanente de pragas estabelecidas (CHARNLEY; COLLINS, 2007).

Atualmente, mais atenção tem sido dada aos fungos patogênicos de insetos para o seu potencial no controle biológico de conservação (PELL et al. 2010). Os fungos entomopatogênicos são um conjunto de espécies que infectam e causam doenças em insetos e outros artrópodes principalmente por contato. A maioria é encontrada dentro de dois grupos principais: a ordem Hypocreales e ordem Entomophthorales. Esses desempenham papéis importantes na regulação natural de populações de insetos, devido às epizootias severas que causam, levando a queda rápida das populações do hospedeiro (HIBBETT et al. 2007; BLACKWELL, 2009; PELL et al. 2010).

Muitos entomopatógenos devem ser ingeridos para infectar o hospedeiro, mas os fungos entomopatogênicos infectam principalmente por penetração direta através da cutícula e, portanto, são agentes especialmente adequados para controlar uma larga gama de pragas (HAJEK; DELALIBERA, 2010).

### 3.3 RELAÇÃO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO E HOSPEDEIRO

De acordo com Alves (1998), a relação fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como das condições

nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. O ciclo de infecção fúngica apresenta várias fases (FIGURA 2), e inicia-se pela *adesão* que ocorre após a deposição do fungo sobre o inseto e *germinação* que depende de condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrição.

O fungo germina sobre o inseto produzindo um tubo germinativo, na extremidade deste pode ocorrer uma dilatação das hifas, formando uma estrutura denominada apressório. Nesta fase ocorre a migração do conteúdo citoplasmático para o tubo germinativo, transformando este num local de elevada atividade metabólica para auxiliar na penetração no hospedeiro (HAJEK; LEGER, 1994).

Existem fungos que não produzem o apressório e sim uma massa mucilaginosa ao redor do tubo germinativo, a qual tem função de adesão e produção de enzimas extracelulares. Para alguns fungos pode ocorrer a reunião de várias hifas, dando origem a uma estrutura apressorial com função de penetração (ALVES, 1998).

Na fase de *penetração* estão envolvidos dois processos, o físico, devido à pressão da hifa terminal que rompe o tegumento do inseto, e o químico, resultante da elaboração de enzimas (proteases, lípases e quitinases), as quais facilitam a penetração mecânica do fungo.

A partir da penetração inicia-se o processo de colonização do hospedeiro pelo fungo, a hifa que penetra sofre um engrossamento e se ramifica inicialmente no tegumento e posteriormente na hemocele; a colonização dos diversos órgãos envolve os corpos gordurosos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipoderme e sistema nervoso respectivamente.

Durante este estágio os fungos secretam toxinas que provocam reações adversas no hospedeiro (GILLESPIE; CLAYDON, 1989; HAJEK; LEGER, 1994; ALVES, 1998).

A resposta do hospedeiro tem sido amplamente analisada, os mecanismos de defesa de insetos que atuam contra os entomopatógenos podem ser divididos em mecânicos, celulares, imunológicos, bioquímico-fisiológicos e comportamentais (ALVES, 1998; CHARNLEY; COLLINS, 2007).

A cutícula não é só a primeira, mas também a grande barreira mecânica e química para iniciar a colonização. Características estruturais tais como esclerotização, que impedem a penetração, através do endurecimento do tegumento e tirosinases que geram melaninas antimicrobianas, são defesas de primeira linha contra patógenos (CHARNLEY, 2003).

Esses fungos desenvolveram mecanismos especializados para a degradação enzimática do tegumento e para superar compostos de defesa produzidos pelos insetos. As relações em que diferentes espécies de fungos obtêm energia a partir de seus hospedeiros incluem a biotrofia (nutrição derivada a partir de células vivas), necrotrofia, (nutrição de tecidos mortos), e hemibiotrofia (inicialmente biotrófico e depois se torna necrotrófico) (CHARNLEY; COLLINS, 2007).

### 3.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS

O termo endófito foi cunhado pelo cientista alemão Heinrich Anton de Bary (1884), e é utilizado para definir os microrganismos-organismos que ocorrem no interior dos tecidos de plantas. Numa perspectiva mais ampla, os fungos endofíticos são considerados aqueles que vivem pelo menos parte do seu ciclo de vida no interior dos tecidos de plantas, sem causar sintomas patológicos para a mesma; essa interação interespecífica proporciona um nicho adequado para o desenvolvimento e estabelecimento dos fungos nas plantas hospedeiras (WILSON, 1995; CARLILE et al. 2001; AZEVEDO, 2010).

Fungos endofíticos compõem um grupo polifilético altamente diversificado, definidos funcionalmente pela sua ocorrência assintomática nos tecidos de plantas, sendo encontrados em plantas como, antóceros, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas e, sua distribuição vai desde o ártico até os trópicos. Estão presentes em várias espécies de plantas, principalmente os ascomicetos (ARNOLD, 2007; ARNOLD; LUTZONI, 2007), incluindo muitas espécies de importância agrícola (LARRAN et al. 2002).

Uma diversidade de microrganismos-organismos endofíticos está presente no interior de plantas aparentemente saudáveis com potencial para serem estudadas, sendo que a composição das espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação (SANTOS, 2013).

Microrganismos endofíticos são amplamente distribuídos, têm sido encontrados em todas as espécies de plantas. Das quase 300.000 espécies de plantas que existem na Terra, cada uma é a hospedeira de um ou mais endófitos, indicando que a biodiversidade dos microrganismos-organismos endofíticos é abundante. Em vista da colonização específica em certos hospedeiros,



estima-se que podem existir um milhão de diferentes espécies de endófitos, no entanto, apenas um pequeno número delas tem sido descritas (PETRINI, 1991; STROBEL; DAISY, 2003).

Os fungos podem habitar a superfície das plantas como epifíticos e também o interior das mesmas como endofíticos e a distinção entre endofíticos, epifíticos e patógenos tem significado puramente didático. É difícil estabelecer os limites para discriminar cada categoria, não existe um limite claro entre os grupos e sim um gradiente entre eles. Azevedo et al. (2000) ampliaram a definição de microrganismos-organismos que habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro e sem formar estruturas externas visíveis.

As associações mutualísticas, entre fungos e organismos fototróficos, são numerosas; muitas destas associações são comuns, como os líquens e as micorrizas, porém outras, como os endofíticos de plantas e algas, são menos conhecidas (AZEVEDO et al. 2000; PEIXOTO-NETO, 2002; MACCHERONI et al. 2004)

Muitos microrganismos endofíticos são capazes de sintetizar compostos bioativos que podem ser utilizados pelas plantas para promover o desenvolvimento, crescimento e induzir mecanismos de defesa, inclusive contra agentes patogênicos e na produção de substâncias anti-herbíveras (MEJÍA et al. 2008).

Neste contexto, vários papéis foram atribuídos aos fungos endofíticos, como melhorar a capacidade competitiva, aumentar a tolerância ao estresse abiótico, e a proteção contra patógenos e insetos (ARNOLD; LEWIS, 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005; RUDGERS et al. 2007).

Estudos relatam centenas de produtos naturais extraídos a partir de endofíticos, tais como antibióticos, agentes anticancerígenos, agentes de controle biológico, e outros compostos bioativos (GUO et al. 2008). Os microrganismos-organismos endofíticos em geral estão se tornando rapidamente um grupo distinto de agentes de controle biológico, devido ao aumento recente nas publicações, o que provoca um interesse em seus potenciais benefícios para a agricultura (BACON et al. 2008 ).

A relação entre os fungos endofíticos e resistência de pragas, doenças de plantas e seu potencial como agentes de controle biológico são relativamente recentes (KULDAU; BACON, 2008). Diversos gêneros de fungos entomopatogênicos foram isolados como endófitos em várias plantas (QUADRO 2), como o café, batata, milho, algodão, tomate, banana, palmeira, cacau, arroz e soja (VEGA, 2008)

QUADRO 2- RESUMO DE ESPÉCIES DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS COMO ENDÓFITOS DE VÁRIAS PLANTAS

Espécies de fungos	Planta	Referências
<i>Acremonium</i> spp.	<i>Coffea arabica</i> (café)	Vega et al., 2008
<i>Acremonium alternatum</i>	<i>C. arábica</i>	Vega et al., 2008
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Zea mays</i> (milho) <i>Solanum tuberosum</i> (batata) <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão) <i>Xanthium strumarium</i> (cardo comum) <i>Datura stramonium</i> (erva-dos-feitiços) <i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate) <i>Theobroma gileri</i> . <i>Pinus monticola</i> <i>Papaver somniferum</i> (papoula do ópio) <i>Phoenix dactylifera</i> (palmeira) <i>Musa paradisiaca</i> (banana) <i>C. arabica</i> <i>Theobroma cacao</i> (cacau)	Vakili, 1990; Bing and Lewis, 1991, 1992a,b; Jones, 1994; Lomer <i>et al.</i> , 1997; Cherry et al., 1999, 2004; Wagner and Lewis, 2000; Lewis et al., 2001 Jones, 1994; Arnold; Lewis, 2005 Jones, 1994 Leckie, 2002; Ownley et al., 2004 Evans et al., 2003 Bills and Polishook, 1991 Ganley and Newcombe, 2005 Quesada-Moraga <i>et al.</i> , 2006 Gómez-Vidal <i>et al.</i> , 2006 Akello <i>et al.</i> , 2007 Posada; Vega, 2006; Posada et al., 2007 Posada e Vega, 2005
<i>Beauveria brongniartii</i>	<i>C. arábica</i>	Vega et al., 2008
<i>Cladosporium</i> spp.	<i>C. arábica</i> <i>Avicennia officinalis</i> ., <i>Rhizophora mucronata</i> Lam., <i>Sonneratia caseolaris</i> (manguezais)	Vega et al., in press Ananda e Sridhar, 2002
<i>Clonostachys rósea</i>	<i>C. arábica</i>	Vega et al., in press
<i>Isaria</i> spp.		
<i>Lecanicillium dimorphum</i>	<i>P. dactylifera</i>	Gómez-Vidal <i>et al.</i> , 2006
<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Musa acuminata</i> <i>Oryza sativa</i> (arroz)	Cao et al., 2002 Tian et al., 2004
<i>Paecilomyces farinosus</i>	<i>C. caroliniana</i>	Bills e Polishook, 1991
<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Araceae</i> <i>C. caroliniana</i> <i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Petrini, 1981 Bills e Polishook, 1991 Widler and Müller, 1984

FONTE: VEGA (2008).

A presença de fungos endofíticos entomopatogênicos em plantas pode influenciar a dinâmica populacional de herbívoros. Uma linhagem endofítica de *B. bassiana* reduziu a população de *Luteipes iraella* (Hymenoptera: Cynipidae) alimentando-se de *Papaver somniferum*. Foram atribuídos ao estabelecimento do fungo endofítico de *B. bassiana* em bananeira o aumento da mortalidade e redução do broqueamento pela larva de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae).

Da mesma forma, foram atribuídos aos endofíticos de *B. bassiana* a redução do broqueamento do milho por *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Sesamia calamistis*

(Lepidoptera: Pyralidae). A maioria dos estudos atribui a redução nos danos por pragas de insetos devido à acumulação de micotoxinas nos tecidos da planta. (QUESADA-MORAGA et al. 2009; AKELLO et al. 2008; GURULINGAPPA et al. 2010).

Vega et al. (2008) isolaram vários gêneros de fungos entomopatógenos incluindo *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, e *Isaria* como endófitos fúngicos em plantas de café coletados na Colômbia, Havá e Porto Rico. Dois isolados, *Beauveria bassiana* e *Clonostachys rosea*, foram testados em bioensaios laboratoriais e mostraram ser patogênicos para a broca do café, *Hypothenemus hampei*.

Com base em estudos em que o desempenho dos insetos nas plantas que contêm fungos endofíticos entomopatógenos foi analisado, pode-se supor que a presença de fungos em tecidos de plantas provoca a dissuasão da alimentação ou antibiose, provavelmente devido à produção de metabólitos secundários dos endófitos (VEGA, 2008).

Para a indústria biotecnológica a aplicação de microrganismos-organismos endofíticos é uma das alternativas aos pesticidas tradicionais, visando diminuir as infecções de patógenos, população de pragas como insetos e nematóides e a combinação de endofíticos e pesticidas comerciais aplicados em sementes ou plântulas podem gerar efeitos sinérgicos sobre um ou vários agentes causadores de doenças e pragas (BACKMAN; SIKORA, 2008).

## 4 OBJETIVO GERAL

Identificar fungos endofíticos isolados de folhas de morangueiro e testar o potencial destes fungos como agentes de controle biológico de *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera, Crambidae).

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos de folhas de morangueiro;
- Identificar por macro e micromorfologia os isolados;
- Avaliar a patogenicidade dos fungos isolados das folhas do morango em lagartas de 3º ínstar de *D. fovealis*;
- Sequenciar regiões universais do genoma, para identificação dos fungos, para amostras que obtiverem sucesso na colonização de *D. fovealis* a fim de identificar as espécies entomopatogênicas.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas folhas provenientes de plantas sadias de morangueiro, obtidos de cultivos localizados na região Metropolitana de Curitiba (QUADRO 3).

QUADRO 3.- LOCALIZAÇÃO DAS PLANTAÇÕES DE MORANGO NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA

Área	Localização/ Coordenadas	Cultivo
A	São José dos Pinhais, PR- 25° 36' 753'' S e 49° 04' 887'' W	Orgânico
B	Pinhais, PR- 25°23'30'' S e 49°07'30'' W	Orgânico
C	São José dos Pinhais, PR- 25° 33'580'' S e 49° 08' 887'' W	Convencional
D	São José dos Pinhais, PR- 25° 35' 820''S e 49° 05' 866'' W	Convencional

FONTE: O autor (2012).

A coleta ocorreu em 1º março de 2012, no período da manhã, em quatro áreas denominadas A, B, C e D localizadas na região Metropolitana de Curitiba, Paraná (FIGURA 3).

Nas áreas A e B, o cultivo do morango foi feito sem utilização de defensivos químicos, e as áreas C e D mantinham os cultivos de morango no padrão convencional, com a aplicação de agrotóxicos e inseticidas biológicos: Frowncide® (500g/L), Score® (250 g/L) e Dipel® (33,6 g/L) segundo a declaração dos proprietários.

### 5.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Em cada área foram coletadas 100 folhas expandidas e sadias em pontos diferentes das plantações, ao todo foram recolhidas 400 folhas para o isolamento dos fungos endofíticos, que ocorreu na mesma data da coleta no período da tarde e noite.

Para o isolamento em laboratório foram utilizados fragmentos de folhas do morango. Por se tratar de fungos endofíticos, foi realizada a técnica de desinfecção superficial, descrita por Araújo *et al.* (2010):

- Lavagem das amostras em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo;
- Imersão em solução de álcool 70% por 1 minuto;

- Imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 3 – 4 minutos;
- Imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos;
- Enxágue por duas vezes em água destilada e esterilizada.
- Corte das folhas em fragmentos.

Após este processo, quatro fragmentos foliares foram colocados separados em placas de Petri contendo meio BDA (HIMEDIA<sup>®</sup>) adicionado de tetraciclina (100µL/ml), com a parte adaxial da folha virada pra cima. As placas foram incubadas em câmara de incubação tipo BOD a  $28^{\circ}\pm$  xC. Conforme o crescimento de fungos, estes foram purificados através de sucessivas repicagens para posterior identificação.

Para o cálculo da frequência de isolamento (FI), ao final do isolamento foi avaliado o número de fragmentos que apresentaram crescimento microbiano em relação ao número total de fragmentos foliares avaliados (AZEVEDO *et al.*, 2010).

$$FI = f \times 100 \div t$$

onde:

FI= frequência de isolamento em %

f= n° de fragmentos foliares com crescimento fúngico

t= n° total de fragmentos foliares

Os fungos endofíticos encontram-se armazenados no laboratório de Microbiologia no Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Campus Centro Politécnico, na Universidade Federal do Paraná.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

As colônias foram separadas em grupos conforme a morfologia macroscópica - morfotipos. Após esta primeira divisão, foi realizada a técnica de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999) para cada grupo morfologicamente semelhante. Para a identificação dos fungos foram utilizadas estruturas de colônias de quinze e trinta dias obtidas do microcultivo. A classificação foi realizada através de observações de corpos de frutificação ao microscópio óptico

e da utilização de literatura especializada. (BARNETT; HUNTER, 1987; LARONE, 1987; HAZEN et al., 1973; MENEZES; OLIVEIRA, 1993; KERN, 1988).

#### 5.3.1 Técnica do microcultivo

Para esta técnica (KERN; BLEVINS, 1999) foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina de microscopia e um pedaço de algodão. Dois cubos (1cm x 1cm) de meio batata dextrose ágar (BDA) foram cortados e retirados de uma placa de petri com meio BDA camada alta e colocados sobre as extremidades de uma lâmina contida no interior da placa de microcultivo. O fungo foi repicado nas quatro extremidades de cada cubo e posteriormente esses foram cobertos por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior da placa de microcultivo foi umedecido com água destilada esterilizada e em seguida incubada em estufa incubadora por um período de trinta dias a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ . As lamínulas foram retiradas respectivamente com quinze e trinta dias e colocadas sobre uma lâmina contendo uma gota do corante Lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com esmalte incolor e deixadas para secar. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico em objetiva de 400 vezes.

### 5.4 BIOENSAIOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS

#### 5.4.1 Cultivo das amostras e seleção de meio de cultura

Para realização dos testes foram utilizados isolados dos gêneros de fungos endofíticos, identificados pelo método do microcultivo e que de acordo com literatura apresentam algum potencial entomopatogênico: *Aspergillus* sp.(CD72E1), *Diapotha* sp. (G13), *Cladosporium* sp. (G28), *Paecilomyces* sp. (G41), *Paecilomyces* sp. (G41'), *Aspergillus* sp. (G70), *Cladosporium* sp. (OB96E2) e *Fusarium* sp. (CD34F1).

Os endofíticos foram cultivados em três diferentes meios de cultura: Czapek Dox, Sabouraud maltose ágar com extrato de levedura (SMAY) e o meio malte (HIMEDIA), a fim de selecionar o melhor meio de cultivo para crescimento e esporulação dos fungos. (CABANILLAS; JONES, 2009, ADAPTADO).

Para analisar o crescimento radial das colônias fúngicas, discos de seis mm de diâmetros de micélio esporulado retirados com vazador de rolha de culturas de sete dias de idade, foram colocados individualmente no centro das placas de petri 90 x 12 mm contendo os meios de cultivo (Czapek, Malte e Smay). Foram feitas três placas por meio, que ficaram incubadas em câmara climatizada tipo BOD a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por quinze dias. O diâmetro das colônias foi medido com auxílio de uma régua milimetrada.

Na avaliação da produção de esporos, das colônias fúngicas previamente medidas nos três meios de cultivo, em triplicata, foram retirados, com auxílio do vazador de rolha de diâmetro conhecido (6 mm) um disco do centro e outro da periferia da colônia de cada placa.

Os discos foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5mL de solução salina 0,85%, em seguida os tubos foram agitados em Vortex por um minuto e uma alíquota de cada tubo contendo a suspensão de esporos foi retirada e 200 $\mu\text{L}$  foram transferidos para câmara de Neubauer para a contagem dos esporos.

O delineamento experimental utilizado foi análise fatorial, teste de Tukey a 5 % de probabilidade, com 2 tratamentos e três repetições, sendo meio de cultivo e produção de esporos, meio de cultivo e crescimento radial da colônia os principais fatores. Os dados foram transformados em  $\log x+1$ , para normalização das diferenças entre os mesmos.

#### 5.4.2 Teste de virulência

##### 5.4.2.1 Criação de *Duponchelia fovealis*

As lagartas, adultos, ovos e pupas de *D. fovealis* foram mantidos em sala climatizada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; UR:  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12h) com dieta artificial, no laboratório Prof. Ângelo Moreira da Costa Lima, localizado no Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná.

##### 5.4.2.2 Isolados fúngicos

Os fungos endofíticos utilizados nos testes virulência contra *D. fovealis* foram isolados das folhas do morangueiro e estão depositados na coleção micológica do laboratório de



microbiologia e biologia molecular – LabMicro localizado no Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná.

Foram utilizados oito isolados: *Aspergillus* sp. (CD72E1), *Diapotha* sp. (G13), *Cladosporium* sp. (G28), *Paecilomyces* sp. (G41), *Paecilomyces* sp. (G41'), *Aspergillus* sp. (G70), *Cladosporium* sp. (OB96E2) e *Fusarium* sp. (CD34F1).

#### 5.4.2.3 Produção de esporos

Para a produção de esporos, os isolados foram repicados em placa de petri 90x12mm contendo meio malte e incubados em câmara B.O.D a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  por sete a quatorze dias.

Para retirada dos esporos das colônias, essas foram raspadas com uma espátula esterilizada e transferidas para um Becker estéril contendo 100 mL de água destilada + Tween 80<sup>®</sup> (0,001%), autoclavados. A solução de Tween 80<sup>®</sup> (0,001%) com água destilada, adicionada de micélio contendo esporos, foi agitada por dez minutos em uma incubadora com agitação orbital a temperatura ambiente a 150 rpm.

A suspensão contendo micélio e esporos foi filtrada com auxílio de gaze esterilizada e transferida para um copo de Becker autoclavado, uma alíquota da suspensão de esporos filtrada foi colocada em câmara de Neubauer para contagem de esporos.

A suspensão de esporos utilizada para a primeira série de bioensaios de virulência foi ajustada por diluição de esporos com 0,002% de Tween 80<sup>®</sup> para uma concentração final de  $10^8$  esporos/mL. Na segunda série de bioensaios de virulência ( $\text{CL}_{50}$ ), foram utilizadas cinco concentrações de esporos  $1,0 \times 10^4$ ;  $1,0 \times 10^5$ ;  $1,0 \times 10^6$ ;  $1,0 \times 10^7$  e  $1,0 \times 10^8$  esporos/mL.

#### 5.4.2.4 Protocolo do bioensaio de virulência

O experimento foi conduzido no laboratório de microbiologia –LabMicro na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil de acordo com QUESADA-MORAGA, 2006, com adaptações.

Na primeira série de experimentos de mortalidade, oito fungos endofíticos foram avaliados em bioensaios contra *D. fovealis*.

Lagartas de 3º ínstar foram utilizadas em todas as etapas do experimento. Em placas de cultivo celular de vinte e quatro poços, foi adicionado em cada poço 1 mL da dieta artificial de *D. fovealis*.

Posteriormente, lagartas da criação de manutenção foram transferidas, com o auxílio de um pincel de ponta fina (nº2) para placas de petri autoclavadas e em seguida mergulhadas em água autoclavada para limpeza superficial, sendo em seguida individualizadas nos poços da placa de cultivo.

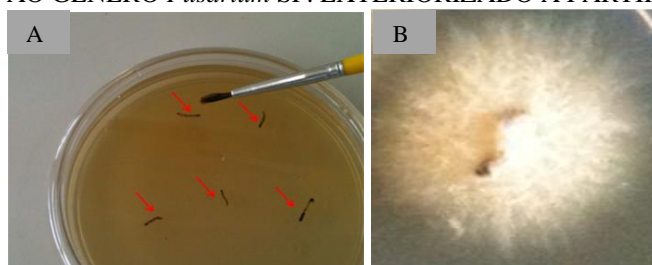
Após a individualização as lagartas foram pulverizadas com as diferentes suspensões fungicas. Sobre as placas de cultivo celular contendo as lagartas de 3º ínstar foi pulverizado 1 mL da suspensão de esporos na concentração de  $10^8$  esporos/mL mais tween Para isso foi empregado um aerógrafo SAGYMA<sup>®</sup>, calibrado a pressão de 10 PSI.

Além da suspensões fungicas foi pulverizado um controle onde foi empregado água destilada mais tween autoclavada. Após as pulverizações as placas foram incubadas câmara climatizada tipo BOD ( $28\pm1^\circ\text{C}$ , fotofase: 14 horas e UR:  $60\pm10\%$ ).

As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente por oito dias. Como critério de mortalidade foi avaliado a resposta do inseto ao toque de um pincel, além dá coloração e textura do tegumento. Os dados de mortalidade foram analisados usando análise de Kaplan –Meier e o teste de Logrank para comparação a sobrevivência das lagartas – matriz ( $p < 0,05$ ).

Os insetos mortos foram colocados em placa de petri para posterior desinfecção superficial e em seguida inseridas em placas esterilizadas com meio Sabouraud para exteriorização do fungo (FIGURA 4).

FIGURA 4- (A) LAGARTAS DE 3º INSTAR MORTAS. (B) ISOLADO FÚNGICO CD34F1 PERTENCENTE AO GÊNERO *Fusarium* SP. EXTERIORIZADO A PARTIR DA LAGARTA.



FONTE: O autor (2014)

Na segunda etapa de bioensaios de virulência, o isolado que causou maior mortalidade contra lagartas de 3º ínstar de *D. fovealis* foi selecionado para estimativa da linha básica de suscetibilidade, visando obter diferentes concentrações letais (CL) para bioensaios futuros.

Para isso o fungo do gênero *Paecilomyces* (G41) foi cultivado em sacos plásticos com 200g arroz autoclavados que ficaram incubados por 20 dias em B.O.D a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  no escuro. Aos sacos plásticos com micélio foram adicionados 100 mL de solução tween 80<sup>®</sup> (0,001%), esse foi agitado vagarosamente e a suspensão com os esporos foi transferida para um Becker estéril. Em seguida, uma alíquota da suspensão foi retirada para contagem de esporos em câmara de Neubauer para identificar a concentração da suspensão.

A partir desta amostra foi realizada a diluição em série, para alcançar as concentrações esperadas, onde 10 mL da solução original foram transferidos para uma proveta de 50 mL e 1 mL, transferido com auxílio da micropipeta de 1000 $\mu\text{L}$ , para um tubo de ensaio contendo 9 mL de tween 80<sup>®</sup> (0,001%), autoclavados. Esse processo foi repetido o número de vezes o necessário para atingir a concentração desejada.

Para o bioensaio com o isolado fúngico selecionado foram utilizadas cinco concentrações:  $1,0 \times 10^4$ ;  $1,0 \times 10^5$ ;  $1,0 \times 10^6$ ;  $1,0 \times 10^7$  e  $1,0 \times 10^8$  esporos/mL, cada uma foi avaliada em placas de cultivo celular de vinte e quatro poços, onde previamente foram adicionados, em cada poço, 1 mL da dieta artificial de *D. fovealis*.

Em seguida foi feita a transferência das lagartas com auxílio de um pincel ponta fina nº2 para cada poço da placa. Para cada concentração de esporos foram utilizadas cinco placas com vinte e quatro lagartas cada.

Para isso 1 mL de cada suspensão de esporos, com a concentração específica, foi pulverizado sobre as lagartas com o auxílio de um aerógrafo SAGYMA<sup>®</sup> por três segundos a 10 PSI. Após as pulverizações as placas foram incubadas em B.O.D a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com fotofase de 14 horas e umidade relativa de  $60\pm 10\%$  por oito dias.

As avaliações de mortalidade foram realizadas adotando-se o mesmo critério reportado anteriormente.

Os indivíduos mortos foram retirados e colocados em placa de petri para posterior desinfecção superficial e em seguida foram inseridos em placas esterilizadas com meio Sabouraud para exteriorização do fungo.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Para cada concentração fungica foram realizadas 5 repetições, sendo cada repetição formada por placa com 24 lagartas. Os dados de mortalidade foram submetidos a análise de Probit (FINNEY, 1971) usando Polo-PC – Leora Software, 1987.

## 5.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS UTILIZADOS NOS BIOENSAIOS DE VIRULÊNCIA

O sequenciamento de regiões específicas do DNA fúngico foi realizado a fim de identificar as espécies utilizadas nos bioensaios de virulência contra a lagarta *D. fovealis*.

### 5.5.1 Extração de DNA

A extração foi realizada de acordo com Vicente et al. (2000). Os isolados fúngicos utilizados nos testes de mortalidade foram cultivados em meio sólido, à 28°C por 5 dias.

Em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL com sílica e celite (2:1) foi colocado parte das culturas e foram vertidos 300 µL brometo de cetilmetilamônia (CTAB) no eppendorf e a cultura foi macerada com maceradores.

Foram adicionados mais 200 µL de CTAB e misturados em um agitador de tubos por 1 minuto. Em seguida foi incubado em banho-maria por 10 minutos a 65°C, adicionado-se 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e centrifugado-se por 7 minutos a 12.000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, sendo repetida a adição de 500 µL de CIA e centrifugação por 7 minutos a 12.000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf. Foram adicionados 2 volumes de etanol 96% gelado a -20°C agitando-o delicadamente.

O DNA foi precipitado, colocando o eppendorf no freezer (-20°C) *overnight*. Foi centrifugado por 7 minutos a 12.000 rpm e descartado o sobrenadante cuidadosamente (etanol).

O pellet de DNA foi lavado em 500 µL de etanol 70% gelado a -20°C e misturado levemente. Foi centrifugado por mais 7 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante (etanol) foi retirado com auxílio de uma micropipeta e o DNA foi desidratado por cerca de 15 minutos.

O pellet foi ressuspensão em 100 µL de água milliQ permanecendo *overnight* em temperatura ambiente e reservado em freezer -20°C.

O DNA foi quantificado através do NanoDrop 1000 (Spectrophotometer Thermo Scientific) e os fragmentos visualizados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo sob transiluminador U.V. e fotodocumentados.

### 5.5.2 Amplificação de regiões do genoma fúngico

A reação de PCR foi realizada com os cinco diferentes pares de *primers* universais para fungos (QUADRO 4), ITS1 e ITS4, que amplificam a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal, os *primers* Bt2a e Bt2b que amplificam a região responsável pela síntese de  $\beta$ -tubulina, e CL1 e CL2A que amplificam a região responsável pela síntese de calmodulina.

A amplificação para as amostras seguiu as condições: 40ng de DNA extraído, tampão da reação 1X, 0,02 U/µL de Taq polimerase, 0,8µM de *primers* (3 pmol/reação), 0,2mM de cada dNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada com a desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C.

QUADRO 4 - SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES GENÔMICAS DO DNA FÚNGICO.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequências	Referências
ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'	WHITE et al. (1990)
ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	WHITE et al. (1990)
Bt2a	5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3'	GLASS; DONALDSON, (1995)
Bt2b	5'ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC3'	GLASS; DONALDSON, (1995)
CL1	5'GARTWCAAGGAGGCCTTCTC3'	MULÈ et al., (2004);
CL2A	5'TTTTGCATCATGAGTTGGAC3'	MULÈ et al., (2004);

FONTE: WHITE (1991).

### 5.5.3 Purificação do DNA

Aos produtos da amplificação da PCR, foram acrescentados 2/3 de acetato de amônio ( $\text{AcNH}_4$ ) 7,5 M e 2,5 volumes de etanol 96%. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm.

Os pellets resultantes foram lavados com etanol 70%, e resuspensos em 5  $\mu\text{l}$  de água ultrapura. Para confirmação da presença do DNA na amostra, 1  $\mu\text{l}$ , foi aplicado em gel de agarose 1,5%.

### 5.5.4 Reação de sequenciamento

O sequenciamento das regiões do DNA fúngico foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger; Nicklen e Coulson (1977), utilizando a incorporação de dideoxinucleotídeos fluorescentes, em Sequenciador Automático de DNA.

As reações de sequenciamento consistiram de 1 a 3  $\mu\text{L}$  do produto de PCR purificado, 0,5  $\mu\text{L}$  de Buffer; 0,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (primer); 0,5  $\mu\text{L}$  do Big-Dye, completando-se para um volume final de 10  $\mu\text{L}$  com água ultra pura.

As condições de amplificação foram: 96°C por 1 min, e por 35 ciclos a 96°C por 10s, 50°C por 5 s e por 60°C por 4min.

As amostras foram sequenciadas em sequenciador ABI (Applied Biosystems).

### 5.5.5 Edição e análise das sequências

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (BONFIELD et al. 2002).

As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al. 2006) e foram comparadas com outras sequências existentes no banco de dados NCBI pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al. 1997) permitindo a detecção de similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes.

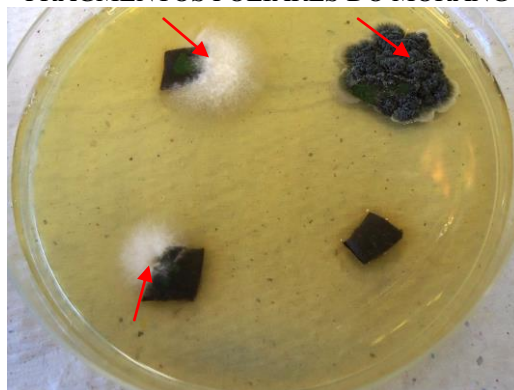
Para a análise das sequências obtidas neste trabalho foi utilizado o programa BLASTn, que compara as sequências de nucleotídeos com um banco de dados de sequências de nucleotídeos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

No total, formaram-se 517 colônias de fungos a partir dos 1.600 fragmentos foliares, e 32,10% dos segmentos deram origem a colônias de endófitos cultiváveis nos meios utilizados (FIGURA 5).

FIGURA 5- FUNGOS ENDOFÍTICOS EXTERIORIZADOS A PARTIR DO INTERIOR DOS FRAGMENTOS FOLIARES DO MORANGUEIRO.



FONTE: O autor (2012).

Foi observado um maior número de colônias endofíticas na área A em relação às demais áreas. Esta área, mantida por meio do sistema orgânico de produção apresentou diferenças significativas das áreas B, C e D (F: 13.2939, gl: 3;396;  $p < 0.05$ ) (FIGURA 6).

No sistema orgânico a porcentagem de fragmentos que deram origem a colônias de endofíticos foi de 35,60 e 23,92% para as áreas A e B respectivamente. Já nos sistemas convencionais C e D, onde a porcentagem foi de 21,60 e 18,87%.

Entretanto, mesmo dentro de um mesmo sistema de cultivo, a área A de cultivo orgânico apresentou uma porcentagem 19,60% maior no número de colônias de endofíticos que a área B e no cultivo convencional, a área C exibiu uma diferença de 8,05% de colônias isoladas de

fragmentos foliares do morangueiro. Este resultado pode ser justificado pelo maior tempo de cultivo de morangueiro da área A no sistema de produção orgânico (dez anos).

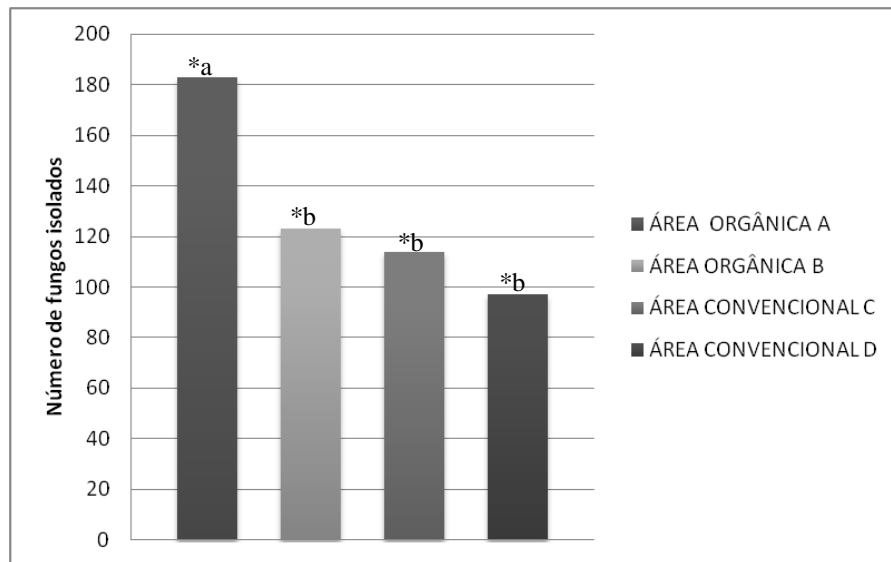
Na agroecologia, a preservação e ampliação da biodiversidade dos agroecossistemas é o primeiro princípio utilizado para produzir auto regulação e sustentabilidade.

Quando a biodiversidade é restituída aos agroecossistemas, numerosas e complexas interações passam a estabelecerem-se entre o solo, as plantas e os animais (ALTIERI, 2004).

A área B passou pelo período de conversão do sistema convencional para o orgânico há três anos. Desta forma, o meio ambiente estaria em maior equilíbrio biológico na área A.

A aplicação de defensivos agrícolas por um período prolongado pode diminuir ou inibir populações de microrganismos-organismos do solo, endofíticos e epifíticos que colonizam várias partes da planta, protegendo-a de predadores e pragas (PELL, 2010).

FIGURA 6- NÚMERO DE COLÔNIAS FÚNGICAS ISOLADOS POR ÁREA.



\* MÉDIAS ENTRE AS ÁREAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI. TESTE DE TUKEY (P <0,05).

FONTE: O autor (2012).

## 6.2 IDENTIFICAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA

Para a identificação, das 517 colônias de fungos endofíticos estas foram separadas de acordo com a morfologia resultando no agrupamento de 70 morfotipos.

Nem todos os isolados apresentaram colônias semelhantes para serem agrupados entre si, por este motivo 58 colônias mostraram-se únicas morfologicamente.



A partir do agrupamento das colônias pelo morfotipo, uma colônia de cada grupo foi selecionada para realização da técnica do microcultivo.

Foram identificados 13 gêneros (TABELA 1), *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Biopolaris* e *Lecanicillium* (FIGURA 10).

TABELA 1- GÊNEROS DE FUNGOS ISOLADOS COMO ENDÓFITOS DE FRAGMENTOS DA FOLHA DO MORANGUEIRO.

Filo	Gênero	Nº de colônias
Ascomycota	<i>Cladosporium</i>	40
	<i>Aspergillus</i>	19
	<i>Penicillium</i>	24
	<i>Paecilomyces</i>	4
	<i>Nigrospora</i>	4
	<i>Alternaria</i>	29
	<i>Ulocladium</i>	1
	<i>Phoma</i>	3
	<i>Bipolaris</i>	1
	<i>Chaetomium</i>	1
	<i>Trichoderma</i>	1
	<i>Lecanicillium</i>	2
	<i>Fusarium</i>	4

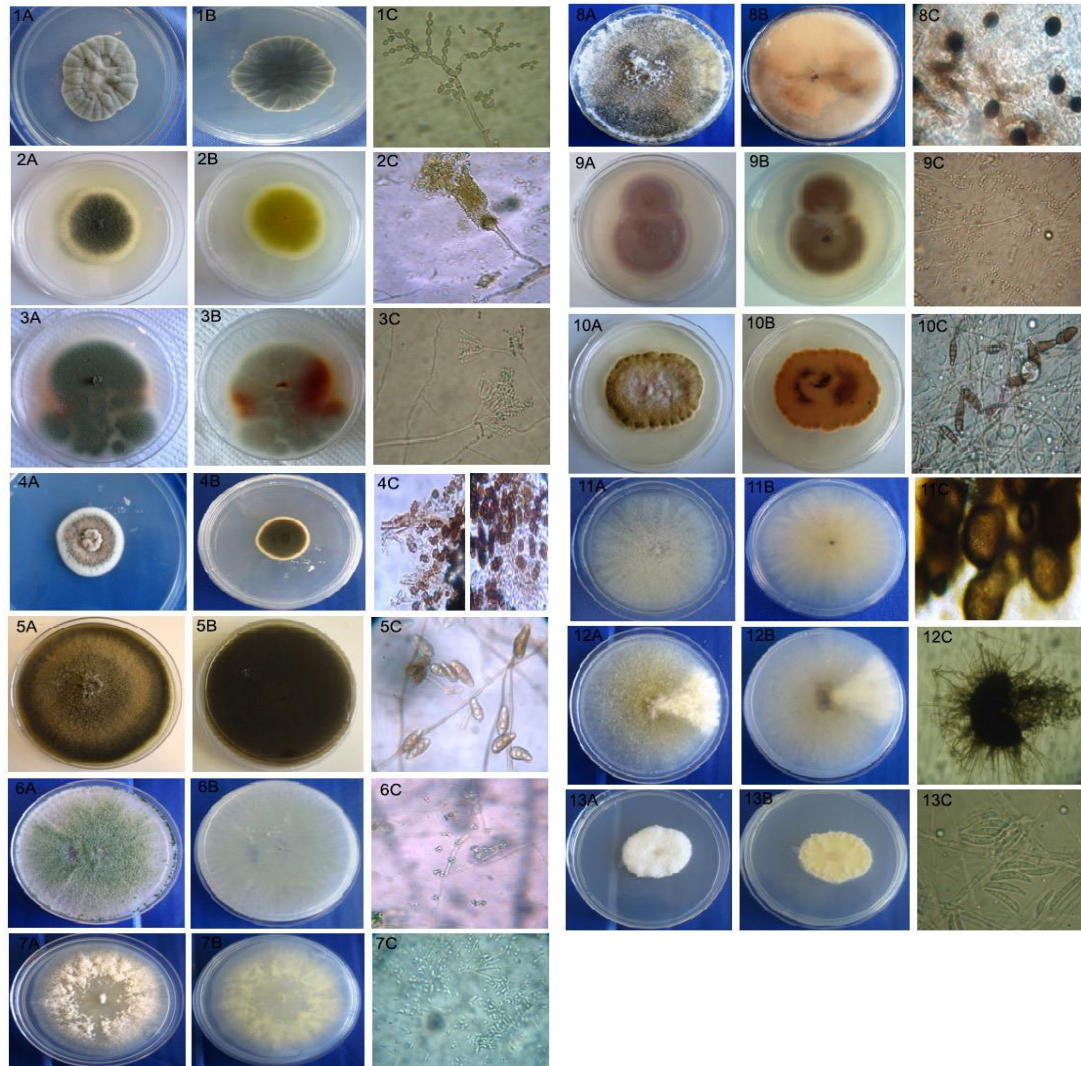
FONTE: O autor (2012).

Dentre os fungos endofíticos isolados das folhas de morangueiros, destacam-se os gêneros entomopatogênicos *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (FIGURA 6).

Esses gêneros foram identificados em outros estudos como agentes de controle biológico de diversas pragas de cultivos milho, algodão, soja, café e trigo, assim como também foram isolados de plantas cultiváveis e de interesse econômico, como endofíticos (MUSETTI et al. 2006; VEGA et al. 2008).

Esses dados permitem relacionar os fungos endofíticos isolados no nosso estudo com aqueles que foram isolados em outros trabalhos, garantindo que o uso desses no controle de praga pode ser eficiente.

FIGURA 6- A E B MACROMORFOLOGIA DO VERSO E REVERSO DAS COLÔNIAS FÚNGICAS CULTIVADAS EM MEIO BDA POR 7 DIAS A  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ . C MICROMORFOLOGIA DOS FUNGOS CULTIVADOS EM MEIO BDA POR 15 DIAS A  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , OBSERVADOS EM MICROSCÓPIO ÓPTICO EM AUMENTO DE 400X.



LEGENDA: FUNGOS PERTENCENTES AO GÊNERO: 1. *Cladosporium*. 2 *Aspergillus*. 3 *Penicillium*. 4 *Ulocladium*. 5 *Bipolaris*. 6. *Trichoderma*. 7 *Diaporthe*. 8 *Nigrospora*. 9 *Paecilomyces*. 10 *Alternaria*. 11 *Phoma*. 12 *Chaetomium*. 13. *Fusarium*.  
FONTE: O Autor (2012).

Vários trabalhos corroboram com os resultados do nosso estudo, quando observamos a diversidade de gêneros e espécies de fungos isolados de diferentes plantas e o emprego desses fungos endofíticos no controle biológico de pragas.

Vega et al. (2008) isolou 16 espécies em cinco gêneros de fungos endofíticos entomopatogênicos em plantas de café.

No Havaí foram isolados *Acremonium* sp. e *Paecilomyces* sp. de raízes e *Beauveria brongniartii* de frutos do café. Na Colômbia *Acremonium alternatum* foi isolado do epicarpo de frutos de café, *Beauveria bassiana* a partir do pedúnculo, epicarpo, coroa, sementes e frutos, *Clonostachys rosea* a partir de folhas e *Paecilomyces javanicus* de pedúnculos.

*Cladosporium sphaerospermum* e quatro isolados diferentes de *Cladosporium* sp., a partir de folhas coletadas em Porto Rico, Colômbia e Havaí. *Paecilomyces fumosoroseus* das folhas e frutos em Porto Rico e *Paecilomyces* sp. do epicarpo de frutos coletados no México.

Em nosso estudo foram encontrados isolados pertencentes à espécie *Cladosporium sphaerospermum* nas folhas de morangueiro de todas as áreas coletadas, assim como também foi isolado o fungo endofítico pertencente ao gênero *Paecilomyces*. A presença deste gênero é comum tanto em plantas como endofítico, como em solos e outros trabalhos observam o potencial entomopatogênico desses fungos contra várias pragas.

Em um trabalho realizado por Reay et al. 2010, foram isolados fungos endofíticos coletadas a partir de *Pinnus radiata*, na Nova Zelândia, a partir das amostras de sementes e acículas. Hajek e Delalibera (2010) citam um trabalho pioneiro sobre fungos endofíticos entomopatogênicos contra *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae), praga de milho, concluindo que a presença do fungo endofítico *Beauveria bassiana* suprimiu a população de *O. nubilalis*.

Nosso estudo, embasado em trabalhos anteriores, demonstra a importância do isolamento e identificação de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico, como o morangueiro, para que esses possam ser estudados e aplicados no Manejo Integrado de Pragas.

## 6.3 SELEÇÃO DE MEIO DE CULTIVO

### 6.3.1 Crescimento radial e produção de esporos

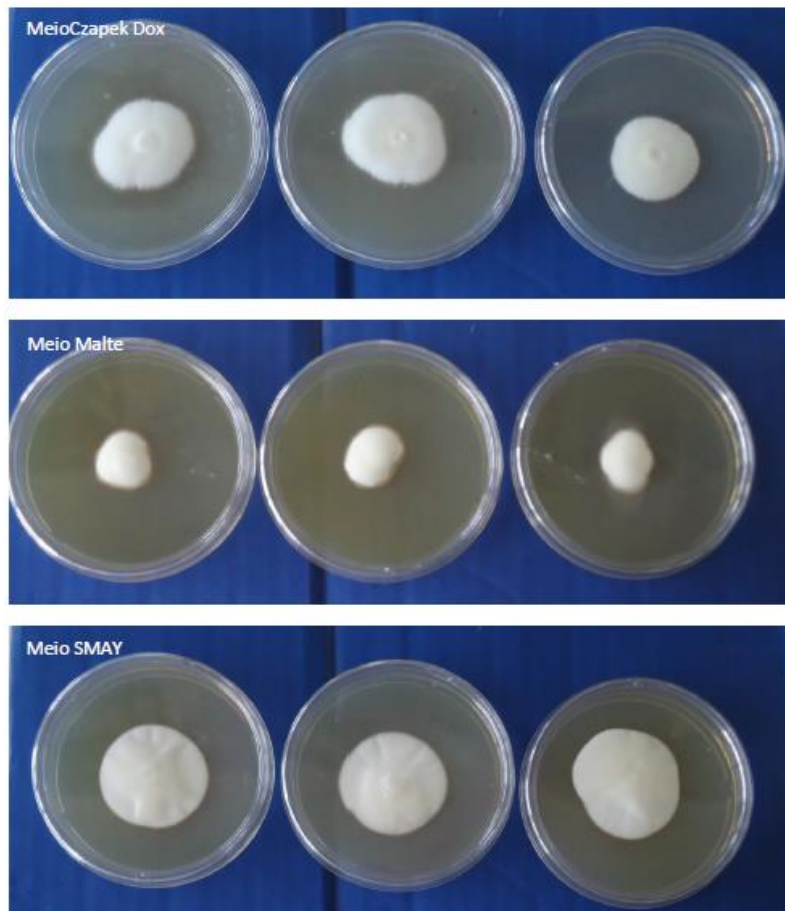
O meio Sabouraud Maltose Ágar com Extrato de Levedura diferiu de modo significativo em relação aos meios Malte e Czapeck dox, no que se refere ao crescimento radial (FIGURA 7).

O meio que obteve a melhor média no crescimento radial das colônias foi o meio Sabouraud Maltose Ágar com Extrato de Levedura, que apresentou aproximadamente 38% de crescimento quando comparado com os (FIGURA 8A) meios Malte e Czapeck dox, que

obtiveram 30,76 e 31,63% de crescimento respectivamente, o que não apresentou diferenças significativas entre si ( $F=45.58$ ,  $g.l= 2; 48$   $p<0,01$ ).

Já para a produção de esporos na comparação entre os meios de cultivo, o Meio Malte apresentou diferenças significativas, devido a maior produção de esporos ( $F=13.39$ ,  $g.l= 2; 48$   $p<0,01$ ), quando comparado com os meios Czapeck dox e Sabouraud Maltose Ágar com Extrato de Levedura (FIGURA 8B), sendo esse o selecionado para o repique e crescimento dos fungos durante a primeira etapa do bioensaio de virulência contra as lagartas de *D. fovealis*.

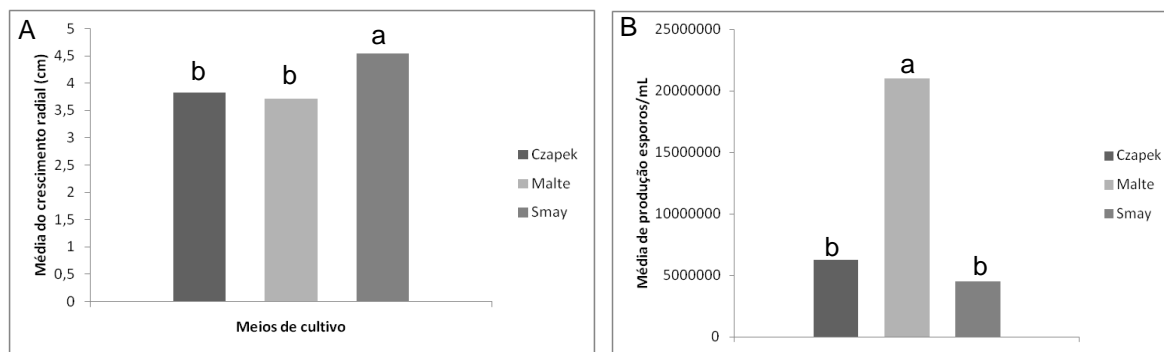
FIGURA 7- CRESCIMENTO RADIAL DAS COLÔNIAS DE *Paecilomyces* spp .ISOLADO G41, NOS TRÊS MEIOS TESTADOS.



FONTE: O autor (2013).

Para os bioensaios utilizando fungos entomopatogênicos, leva-se em conta a quantidade de esporos produzidos (ALVES, 1998), por isto deve-se levar em consideração a seleção do meio de cultivo e condições ótimas para o cultivo (temperatura, umidade, atividade de água, pH (VICCINI, 2004).

FIGURA 8- A. CRESCIMENTO RADIAL DAS COLÔNIAS FÚNGICAS EM RELAÇÃO AOS MEIOS DE CULTIVO. B. PRODUÇÃO DE ESPOROS DAS COLONIAS FÚNGICAS EM RELAÇÃO AOS MEIOS DE CULTIVO. NOTA: LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI. TESTE DE TUKEY ( $p < 0,01$ )  
<sup>1</sup>SABOURAUD MALTOSE ÁGAR COM EXTRATO DE LEVEDURA



FONTE: O autor (2013).

A média de crescimento e esporulação variou entre os fungos. Em ambos os meios de cultivo obteve-se diferença significativa no crescimento radial das colônias entre os fungos e o crescimento individual em cada meio de cultivo (TABELA 2A) ( $F=11,68$ ,  $g.l= 14$ ;  $48$   $p<0,01$ ).

O fungo que apresentou maior crescimento colonial foi o *Fusarium* (CD34F1) nos meios Czapek dox, malte e SMAY, seguido do *Lecanicillium* (G13). Os dados de esporulação mostraram que existe diferença significativa entre as médias ( $F=2,29$ ,  $g.l= 14$ ;  $48$   $p<0,05$ ), mas em poucos isolados, a maioria não obteve diferenças entre si (TABELA 2B).

TABELA 2- A. CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS E B. AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS NOS TRÊS MEIOS DE CULTIVO CZAPEK DOX, MALTE E SMAY

. Isolados	A.Média de crescimento das colônias (cm)			B. Média de esporulação das colônias		
	Czapek dox	Malte	Smay*	Czapek dox	Malte	Smay*
G41'	3,36 cdB	3,56 cB	4,46 bA	$1,27 \times 10^7$ Aa	$4,75 \times 10^7$ aA	$1,22 \times 10^6$ aA
G41	3,73 cA	2,6 cB	4,2 bcA	$6,1 \times 10^6$ Aa	$2,4 \times 10^6$ abAB	$3,4 \times 10^5$ bB
CD34F1	7,83 aA	6,74 aA	7,6 aA	$3,18 \times 10^5$ abAB	$7,3 \times 10^6$ abA	$1,24 \times 10^5$ bB
G13	5,46 bA	5,06 bA	4,84 bA	$3,5 \times 10^5$ abB	$3,8 \times 10^7$ aA	$3,06 \times 10^5$ bB
OB96E2	1,9 eA	1,90 dA	1,96 eA	$1,44 \times 10^6$ bB	$2,41 \times 10^6$ abA	$1,05 \times 10^5$ bAB
G28	1,96 eB	2,64 cA	2,87 dA	$7,73 \times 10^5$ abA	$8,5 \times 10^5$ bA	$1,02 \times 10^6$ abA
CD72E1	3,67 cB	3,9 cC	7,1 Aa	$1,55 \times 10^7$ aA	$6,43 \times 10^7$ aA	$9,3 \times 10^6$ aA
G70	2,73 dB	3,4 cA	3,4 cdA	$7,74 \times 10^6$ aA	$1,96 \times 10^7$ aA	$1,83 \times 10^6$ abA

NOTA: : LETRAS MAIUSCULAS NA LINHA E LETRAS MINUSCULAS NA COLUNA

FONTE: O autor (2013).

#### 6.4 TESTES DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA SOBRE LAGARTAS DE *Duponchelia fovealis*

Houve diferenças significativas na mortalidade causada pelos fungos avaliados ( $F=16,4681$ , g.l= 8; 9  $p<0,01$ ), a mortalidade das lagartas variou entre 54 a 99%.

Dois grupos entre os isolados podem ser destacados: um grupo de isolados de virulência intermediária (mortalidade de 54 a 70%) e um grupo altamente patogênico (> 80% de mortalidade) (FIGURA 9).

A mortalidade provocada pelos dois isolados de *Aspergillus* (G70 e CD72E1) ficou entre 54 e 56% respectivamente. Em trabalhos de controle de pragas, é possível observar o potencial de espécies de *Aspergillus*, assim como obtemos em nosso estudo contra larvas de *D. fovealis*.

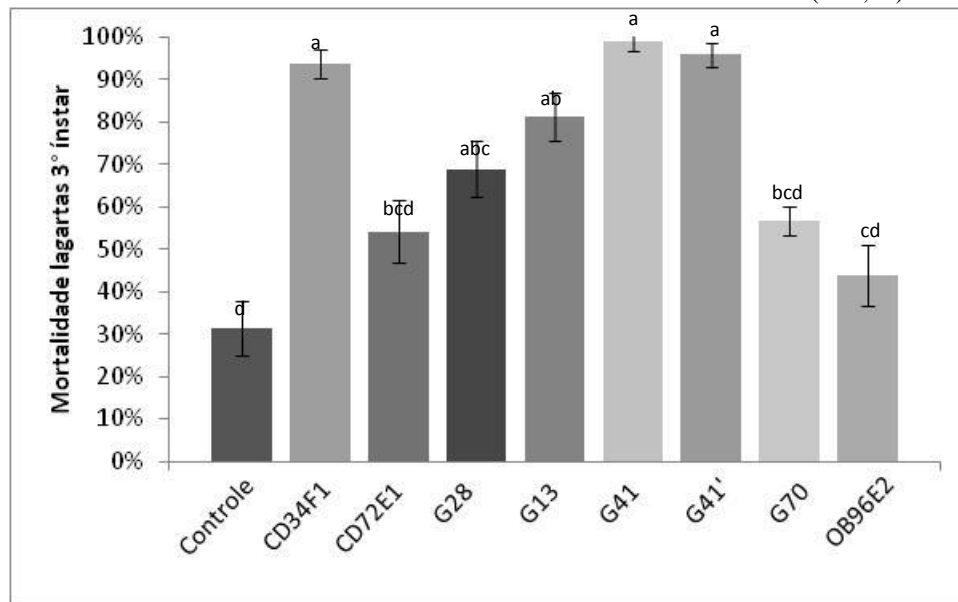
Valores de mortalidade próximos foram observados por Ribeiro et al. (2012), onde o fungo *Aspergillus ochraceus*, testado contra a formiga *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae) provocou mortalidade de 50% das formigas testadas.

O gênero *Aspergillus* pode possuir tolerância a inseticidas, melhor eficácia e menos agressão as espécies de inimigos naturais, como foi observado no trabalho de Mensah; Austin (2012) com uma linhagem de *Aspergillus* sp. no controle de *Creontiades dilutus*, praga do algodão na Austrália. Comparou-se a eficácia de *Aspergillus* sp. com o inseticida Fipronil e o resultado mostrou que o fungo foi mais eficaz contra *C. dilutus* que o inseticida, observou-se também, que o uso dessa linhagem de *Aspergillus* sp. permitiu a sobrevivência de predadores como besouros, crisopídeos e aranhas.

Para os isolados de *Cladosporium* (G28 e OB96E2) a mortalidade das lagartas foi de 43 e 68% respectivamente. Resultados semelhantes foram observados com linhagens de *Cladosporium* sp. contra ovos e lagartas de 1º instar de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), obtendo sucesso inibindo a emergência de 64% das lagartas e provocando 54% de mortalidade das lagartas (BAHAR et al. 2011), resultados que corroboram com os do nosso estudo.

O isolado G13, identificado como gênero *Diaporthe*, causou a mortalidade de aproximadamente 81% das lagartas, demonstrando ser um fungo com potencial de controle de *D. fovealis*. Embora os resultados de mortalidade sejam relevantes, não foi encontrado na literatura o uso do fungo endofítico *Diaporthe* como um agente de controle biológico de pragas.

FIGURA 9- MORTALIDADE DE LAGARTAS DO 3º ÍNSTAR DE *D. fovealis* 8 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS ( $10^8$  ESPOROS/ML) BARRAS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $P<0,01$ ).



LEGENDA: EIXO HORIZONTAL- CÓDIGOS : CD72E1 – *Aspergillus* sp., G13 – *Lecanicillium* sp., G28- *Cladosporium* sp., G41- *Paecilomyces* sp., G41' - *Paecilomyces* sp., G70- *Aspergillus* sp., OB96E2- *Cladosporium* sp., CD34F1- *Fusarium* sp.  
 FONTE O autor (2013).

Os isolados mais patogênicos nos bioensaios foram *Fusarium* (CD34F1), *Paecilomyces* (G41') e *Paecilomyces* (G41) que causaram 93,7, 95,8 e 98,8% de mortalidade, respectivamente.

Na segunda etapa do bioensaio, com os testes de virulência, foi selecionado o isolado mais virulento, *Paecilomyces* (G41), em relação aos resultados, o coeficiente angular baixo ( $0,541 \pm 0,093$ ) e o valor do  $\chi^2$  (3,3685) indicam um bom ajuste do modelo de probit. A concentração letal efetiva foi de  $4,7 \times 10^8$ , sendo a concentração máxima utilizada no bioensaio, demonstrando que ela foi suficiente para matar 50% das lagartas tratadas com suspensão de esporos.

Valores de coeficientes angulares de um trabalho realizado por Quesada-Moraga et al. (2006) são semelhantes ao deste, entre 0,21 e 0,55, onde analisaram 10 linhagens de *Beauveria bassiana* contra ninfas de 4º instar de *Bemisia tabaci* (ordem: Família) e *Trialeurodes vaporariorum*.

Hussein et. al. (2013), empregando uma nova linhagem de *Paecilomyces fumosorosea* (CCM 8367) contra *Spodoptera littoralis* (Noctuide: Lepidoptera) verificaram, em condições de laboratório e campo, a eficiência do fungo sobre diferentes instares, pré-pupa e pupa de *S*

*littoralis*. Os tratamentos com suspensão de esporos na concentração de  $5,0 \times 10^7$  esporos/ml mostraram alta eficiência no terceiro, quinto e último instar.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados no nosso estudo, demonstrando que o isolado G41 tem potencial para ser empregado no controle de *D. fovealis*.

TABELA 3- MORTALIDADE DE *D. fovealis* CAUSADA POR *Paecilomyces* sp.

Isolado	nº de insetos	Slope	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC 95%	$\chi^2$ (g.l)	H
G41	600	0,541 ±0,093	4,7x10 <sup>8</sup>	0,88x10 <sup>8</sup> – 0,49x10 <sup>10</sup>	3,3685 (3)	1,1228

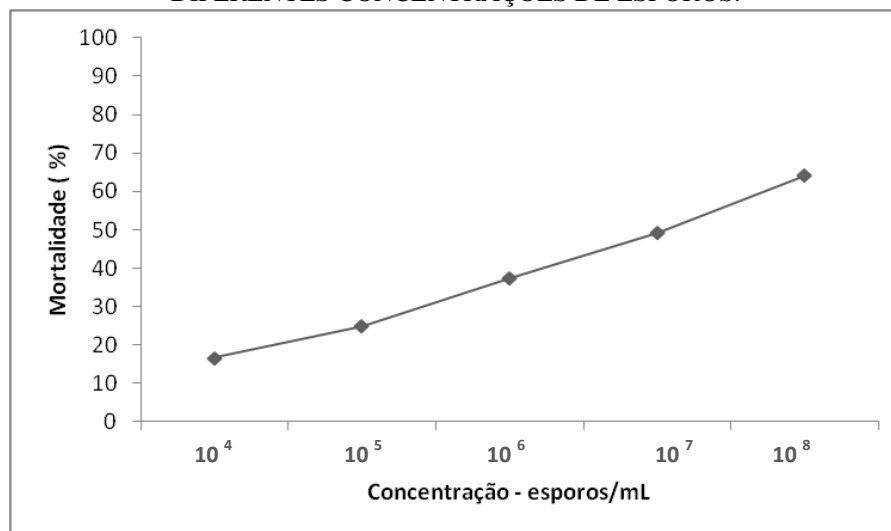
<sup>a</sup> OS VALORES DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA A 95% SÃO EXPRESSOS EM ESPOROS POR MILILITROS.

FONTE: O autor (2014).

A curva delineada no gráfico abaixo indica o aumento da mortalidade de lagartas expostas as diferentes concentrações do fungo *Paecilomyces lilacinus* (G41)

Foi observada uma variação de 15 a 60% de mortalidade nas cinco concentrações testadas. Na concentração de  $10^8$  esporos/ mL, a mortalidade atingida foi de aproximadamente 65%, entre as concentrações de  $10^4$  e  $10^5$  a mortalidade ficou entre 16 e 25% e em  $10^6$  e  $10^7$  de 37 a 49%, respectivamente.

FIGURA 10- MORTALIDADE DE LAGARTAS DE 3º INSTAR DE *D. fovealis* POR *Paecilomyces* sp. (G41) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ESPOROS.



FONTE: O autor (2014).



## 6.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS POR SEQUENCIAMENTO

Por meio do sequenciamento das regiões do genoma dos isolados foi possível confirmar o gênero, identificado por microcultivo, com a observação das estruturas assexuadas em microscópio óptico (objetiva de 400x) (TABELA 4).

TABELA 4- RELAÇÃO DE ESPÉCIES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS UTILIZADOS NOS BIOENSaios DE VIRULÊNCIA CONTRA *D. fovealis* IDENTIFICADAS POR SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES ESPECÍFICAS DO GENOMA FÚNGICO

Isolados	Gênero identificado por método clássico	Oligonucleotídeos iniciadores	Identificação por sequenciamento das regiões do genoma fungico	
			Isolados endofíticos	Reisolados da lagarta
G28	<i>Cladosporium</i>	ITS1; ITS4	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>
		Bt2a e BT2b	<i>cladosporioides</i>	<i>cladosporioides</i>
OB96E2	<i>Cladosporium</i>	ITS1; ITS4	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>
		Bt2a e BT2b	<i>sphaerospermum</i>	<i>sphaerospermum</i>
G41	<i>Paecilomyces</i>	Bt2a e BT2b	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Em andamento
G41'	<i>Paecilomyces</i>	Bt2a e BT2b	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Em andamento
G70	<i>Aspergillus</i>	Bt2a e BT2b	Em andamento	Em andamento
CD72E1	<i>Apergillus</i>	Bt2a e BT2b	Em andamento	<i>Aspergillus terreu</i>
CD34F1	<i>Fusarium</i>	ITS1 e ITS4	<i>Fusarium solani</i>	Em andamento
G13	<i>Lecanicillium</i>	ITS1 e ITS4	Em andamento	Em andamento

FONTE: O autor (2014).

As espécies identificadas do gênero *Cladosporium* foram *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, através dos oligonucleotídeos iniciadores, ITS 1 e ITS4 que amplificam a região ITS e Bt2a e Bt2b que amplificam a região da Beta tubulina no DNA fúngico. O reisolamento dos fungos exteriorizados das lagartas confirmou tanto o gênero como a espécie dos isolados G28 e OB96E2 respectivamente.

Abdel-Baky et al. (1998), coletaram *Bemisia argentifolii* a partir de plantas hospedeiras diferentes, e identificaram os fungos como *C. uredinicola*, *C. cladosporioides* e *C. chlorocephalum*, Em laboratório, estes autores realizaram bioensaios de virulência, infectando *B.*, *argentifolli* e evidenciou-se que essas espécies de *Cladosporium* foram patogênicas para as ninfas e adultos.

Os isolados G41 e G41' pertencentes ao gênero *Paecilomyces* sp. foram identificados como *P. lilacinus*. Segundo Chao et al. (2013), *Paecilomyces lilacinus* é um fungo encontrado em solos e vegetação e raramente causa infecção humana.

Como um fungo entomopatogênico é amplamente utilizado no controle biológico de doenças em plantas cultivadas em condições de campo. Também é frequentemente utilizado no controle do nematoide do gênero *Meloidogyne* sp.

## 7 CONCLUSÃO

- Foram isoladas 517 colônias de fungos endofíticos nas quatro áreas de coleta;
- Os gêneros identificados foram: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Penicillium*; *Ulocladium*, *Phoma*, *Biopolaris* e *Lecanicillium*;
- Os fungos que provocaram as melhores mortalidades de *D. fovealis* foram *Fusarium*, *Paecilomyces*;
- As espécies identificadas pelo sequenciamento das regiões ITS e Beta tubulina foram: *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces lilacinus* e *Fusarium solani*.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALTIERI, M. Agroecologia: **A dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 4.ed., editora da UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. LIPMAN, D.J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs**. Nucleic Acids Research, Oxford, v25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVARENGA, D. A.; DUARTE FILHO, J.; CARVALHO, A.A.A.; FADINI, M.A.M. Coeficientes técnicos da produção de morango. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n. 198, p.20-21, 1999.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- AMBROSIO, M. D'; SANITÀ DI TOPPI, L; PERTOT, I. **Inhibition of Sporulation and Ultrastructural Alterations of Grapevine Downy Mildew by the Endophytic Fungus *Alternaria alternata***. Phytopathology. V.. 96, n. 7,pág, 689 – 698, 2006.
- ANTUNES, C. E. L; FILHO, D. J.A . **Produção de Mudas. In sistemas de produção de morango**. Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 5. Versão Eletrônica. Nov./ 2005. Disponível em < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap01.htm>>. Acesso em 01 de set de 2011.
- ASSIS, R,L; ROMEIRO, R,A. **Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências**. Desenvolvimento e Meio Ambiente, editora UFPR n. 6, p. 67-80, jul./dez. 2002.
- ARNOLD, E. A.; MEJÍA, C. L.; KYLLO,D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS,N.; HERRE, E. A. **Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree**, PNAS, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, E. A.; LEWIS, L. C. **Ecology and evolution of fungal endophytes and their roles against insects.** Apud Vega, F.E., Blackwell, M. (Eds.), **Insect–Fungal Associations: Ecology and Evolution.** Oxford University Press, New York, p. 74–96, 2005.

ARNOLD, E. A.; LUTZONI, F. **Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots?** Ecology, p. 541–549, 2007.

ARNOLD, E. A. **Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers.** Fungal Biology Reviews. V. 21, p. 51-66, 2007.

PEIXOTO-NETO, P.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. **Microrganismos Endofíticos.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n. 29, p. 62-76, 2002.

BADALI, H.; CARVALHO, V. O.; VICENTE, V.; ATTILI-ANGELIS, D.; WIATKOWSKI, I. B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. ***Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data.** Medical Mycology. V. 47, p. 55-66, 2009.

BARNETT, H. C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3. ed., Minneapolis: Burgess Publications, 1987.

BACKMAN, P. A.; SIKORA, A. R. **Endophytes: An emerging tool for biological control.** Biological Control, v.46, p. 1-3, 2008.

BLACKWELL, M. **Fungal evolution and taxonomy.** Biological Control. V. 55, pág 7 -16, 2009.

BOTTON, M; KOVALESKI, A; FERLA, J. N; PINENT, J. M. S. **Controle de Pragas. In Produção de Morangos no Sistema Semi-Hidropônico. Embrapa Uva e Vinho.** Sistemas de Produção, 15. Versão Eletrônica. Dez/2006. Disponível em <

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MorangoSemiHidroponico/pragas.htm> > Acesso em 3 de out. de 2011.

CABANILLAS, H. E; JONES, W. A. **Effects of Temperature and Culture Media on Vegetative Growth of an Entomopathogenic Fungus *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Naturally Affecting the Whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas.** Mycopathologia, V. 167, n. 5, p. 263 – 271, 2009.

CANTILLANO, F. F. R. **Colheita e Pós-Colheita. In sistemas de produção de morango.** Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 5. Versão Eletrônica. Nov./ 2005. Disponível em < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap12.htm> > Acesso em 01 de set de 2011.

CARBALLO -VARGAS, M; RODRÍGUEZ, L; DURÁN, J. **Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control del picudo del chile en laboratorio. Manejo Integrado de Plagas.** v.62, p. 54-59, 2001.

CARLILE, M. J, WATKINSON, S. C, GOODAY, G.W. **The Fungi.** 2ed. Elsevier Academic Press, UK, 2001.

CASTILLO, M.A; MOYA, P; PRIMO, E. **Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to Entomopathogenic Fungi and their Extracts.** Biological Control. V. 19, p. 274–282, 2000.

CHARNLEY, A. K. **Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins.** Advances in Botanical Research. V. 40, p. 241–321, 2003.

CHARNLEY, A. K.; COLLINS, S. A. **The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships.** 2.ed. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, p. 159-184, 2007.

CHEN, Y.; PRIOR, B. A.; SHI, G.; WANG, Z. **A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi.** The Journal of Microbiology. v. 49, p. 675-679, 2011.

COLL, M.; S. SHAKYA; I. SHOUSTER & Y. NENNER. **Decision-making tools for *Frankliniella occidentalis* management in strawberry: consideration of target markets**. Entomologia Experimentalis et Applicata 121: 1–9, 2006.

DAROLT, M.R. **Agricultura Orgânica: inventando o futuro**. IAPAR, 250p., Londrina, 2002.

DEMBILIO, O; QUESADA-MORAGA, E; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C; JACAS, J. A. **Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus***. Journal of Invertebrate Pathology. V.104, p. 214-221, 2010.

FOKKEMA, N.J. **Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms**. Pesticide Science, v.37(4), p.411-416, 1993.

FORNELLI, F; MINERVINI, F; LOGRIECO, A. **Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9)**. Journal of Invertebrate Pathology. V. 85, p. 74–79, 2004.

FADINI, M. A. M.; PALLINI, A.; VENZON, M. **Controle de ácaros em sistema de produção integrada de morango**. Ciência. Rural, vol.34, n.4, p. 1271-1277, 2004.

FRANCO, C. M; BAPTISTA, M. ***Duponchelia fovealis* Zeller- nova praga em Portugal**. Revista Frutas, Legumes e Flores. V. 110, p. 34-35, 2010.

GILLESPIE, A.T; CLAYDON, N. **The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis**. Pesticide Science.V..27, p.203–215, 1989.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. **Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes**. Applied and Environmental Microbiology. v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GOETTEL, M.S; EILENBERG, J; GLARE, T.R. **Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations**, 2005 Apud Gilbert, L., Iatrou, K., Gill, S. (Eds), Comprehensive Molecular.

GONZALES -ZAMOR A , J . E. & F. GARCIA -MARI. **The efficiency of several sampling methods for *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in strawberry flowers.** Journal of Applied Entomology 127:516–521, 2003.

GUO, B.; WANG, Y. e TANG, K. **Bioactive natural products from endophytes: A review.** Applied Biochemistry and Microbiology.v. 44, nº.2, p. 136-142, 2008.

GURULINGAPPA, P.; SWORD, G. A.; MURDOCH, G.; McGee, A. **Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in plant.** Biological Control, v.55, p. 34-41, 2010.

HAJEK, A. E; DELALIBERA, I. **Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods.** Biological Control. V.. 55, p. 147–158, 2010.

HAJEK, A.E; LEGER, R.J. **Interactions between fungal pathogens and insect hosts.** Annual Review of Entomology. V. 39, p. 293–322,1994.

HIBBETT, D.S; BINDER, M; BISCHOFF, J. F; BLACKWELL, M; CANNON, P. F; ERIKSSON, O. E; HUHNDORF, S. **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi.** Mycological Research.V. 111, p.509–547, 2007.

HUSSEIN, H.M; ZEMEK, R.; HABUŠTOVÁ, S.O; PRENEROVÁ; MANAL, E ADEL,M. **Laboratory evaluation of a new strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.).** 11ed, v. 46, p. 1307-1319, 2013.

KEANE R. M, CRAWLEY, M. J. **Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis.** Trends in Ecology & Evolution .V..17, p.164–170, 2002.

KERN, M. E. **Medical mycology: A self- instructional text.** 3 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1988.

KERN, M. E.: BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas.** 2 ed. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KIM, T; KIM, Y.J. **Overview of innate immunity in Drosophila.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology.V. 38, p. 121–127, 2005.

LARRAN, S.; ROLLAN, C.; ANGELES, B. H.; ALIPPI, H. E.; URRUTIA, M. I. **Endophytic fungi in healthy soybean leaves.** Investigacio´n Agraria: Produccio´n y Proteccio´n de Vegetales, p. 173–177, 2002.

LEWIS, L.C., BING, L.A. **Bacillus thuringiensis Berliner and Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control: program for immediate and season long suppression.** Canadian Entomologist. V. 123, p. 387–393,1991.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. **Ecology of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae in Potential for conservation biological control.** Biological Control. V..43, p. 145-155, 2007.

MEJÍA, L.C., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., VAN BAELE, S., ARNOLD, A.E., HEBBAR, P., SAMUELS, N., HERRE, E.A. **Endophytic fungi as biocontrol agents of Theobroma cacao pathogens.** Biological control. V., p. 4–14, 2008.

MONTEIRO, R. C. ; L. A. MOUND & R. A. ZUCCHI. **Thrips (Thysanoptera) as pests of plants production in Brazil .** Revista Brasileira de Entomologia 43: 163 – 171, 1999.

MULÈ, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MORETTI, A. **A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of Fusarium verticillioides, F. proliferatum and F. subglutinans.** European Journal of Plant Pathology. v. 110, p. 495-502, 2004.



MUSETTI, R; VECCHIONE, A; STRINGHER, L; BORSELLI, S; ZULINI, L; MARZANI, C; NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) **BLAST**.

Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>> Acesso em 17 mar. 2011.

NONDILLO, A; REDAELLI, L. R; PINENT, S. M. J; BOTTON, M. **Biologia e TABELA de vida de fertilidade de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae) em morangueiro**. Rev. Bras. entomol.[online]. 2009, vol.53, n.4, pp. 679-683.

PARRA, J. R. P; BOTELHO, P. S. M; CORRÊA-FERREIRA, B. S; BENTO, J. M. S. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Ed. Manole, São Paulo, SP, 2002.

PELL, J.K; HANNAM, J.J; STEINKRAUS, J.J. **Conservation biological control using fungal entomopathogens**. Biological Control. V. 55, p.187–198, 2010.

PINENT, S. M. J.; M. BOTTON & L. R. REDAELLI. **Thrips species (Thysanoptera) on Strawberry, Persimmon and Grape in the Gaúcho Highlands, Rio Grande do Sul State, Southern Brazil**. Apud Ullman D.; J. Moyer; R. Goldbach; G. Moritz. Journal of Insect Science, 7:28, 2005.

PYROZINSKI, K.A.; MALLOCH, D.W. **The origin of land plants: a matter of mycotrophism**. BioSystems, Amsterdam, V. 6, p. 153-164, 1975.

QUESADA-MORAGA, E.; MARANHÃO, E. A. A.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. **Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity**. Biological Control. V. 36, n. 3, p. 274-287, 2006.

RUDGERS, J.A.; HOLAH, J.; ORR, S. P.; CLAY, K. **Forest succession suppressed by an introduced plant-fungal symbiosis**. Ecology, p. 18–25, 2007.

REAY, S.D.; BROWNBRIDGE, M.; GICQUEL, B.; CUMMINGS, N.J.; NELSON T.L. **Isolation and characterization of endophytic *Beauveria* spp. (Ascomycota: Hypocreales) from *Pinus radiata* in New Zealand forests**. Biological Control v.54, p.52–60, 2010.

SALLES, L. A. **Pragas do Morangueiro. In: Sistemas de produção de morango.** Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 5. Versão Eletrônica. Nov./ 2005. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap07.htm>>. Acesso em 01 de set de 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, L. S.; RHODEN, S. A.; BARROS, I. T.; TONINI, R. C.G.; MARQUES, R. M.; SOUZA, V. H. E.; PAMPHILE, J. A. **A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro.** Rev. Saúde e Biologia., v.8, n.1, p.92-101, 2013.

SANTOS, M. A; MEDEIROS, M. R. A. **Nutrição, Calagem e Adubação.** In sistemas de produção de morango. Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 5. Versão Eletrônica. Nov./ 2005. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap05.htm>> Acesso em 01 de set de 2011.

SCHULZ, B; BOYLE, C. **The endophytic continuum.** Mycological Research, p. 661–686, 2005.

SEBRAE. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas.** Disponível em <<http://www.sebrae.com.br/exibeBia?id=1047&searchterm=produ%C3%A7%C3%A3o+de%20%20morango>> Acesso em 01 de set de 2011.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

STOCKS; S. D; HODGES, A. **Featured creatures**. Retirado de <  
[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leps/european\\_pepper\\_moth.htm#desc](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leps/european_pepper_moth.htm#desc)> Acesso em 10 de  
 out.de 2012.

STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products**. Microbiology and molecular biology reviews. P. 491–502, Dez, 2003.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)**. Dissertação Mestrado em Microbiologia. Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2010.

VEGA, F. E. **Insect pathology and fungal endophytes**. Journal of Invertebrate Pathology, p. 277–279, 2008.

VEGA, F. E.; POSADA, F.; AIME, M. C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S. A. **Entomopathogenic fungal endophytes**. Biological Control, p. 72–82, 2008.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Doutorado em Microbiologia Agrícola Bolsa Sanduiche Cbs Holanda. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz USP, ESALQ/USP, Brasil. 2000.

VICCINI, G. **Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rósea*: um biopesticida para a cultura do morangueiro**. Dissertação de Mestrado em Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2004.

WHITE, J. F. ; OUDERMANS, P. **The Fungal Community: its organization and role in the ecosystem**. Boca Raton: CRC, 2005. 936 p.

WHITE, T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. Apud Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315–322. Academic Press, San Diego, 1990.

WILSON, D. **Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition.** Oiko, 274–276, 1995.

ZAWADNEAK, M. A. C.; VIDAL H.R.; SANTOS, B. **LAGARTA-DA-COROA, *Duponchelia fovealis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE).** In: Evaldo Vilela; Roberto A. Zucchi. (Org.). **Pragas Introduzidas: Insetos e Ácaros.** 2ed. Piracicaba, SP: ESALQ/ FEALQ, , v. , p. 216-231, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C ; BOTTON, M ; SCHUBER, J. M.; SANTOS, B. ; VIDAL, H. R. . **Pragas do morangueiro.** In: Zawadneak, Maria A. C; Schuber, Josélia M; Mógor, Atila F. (Org.). **Como produzir morangos.** 1ed. Curitiba: Editora UFPR, v. , p. 101-145, 2014.